

**CARACTÉRISATION DU RÔLE DE HSM3 EN TRANSCRIPTION GÉNIQUE CHEZ
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

par

Valérie Guérin

mémoire présenté à la Faculté des sciences en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, avril 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-88802-5

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-88802-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 18 avril 2012

*le jury a accepté le mémoire de Madame Valérie Guérin
dans sa version finale.*

Membres du jury

**Professeur Luc R. Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie**

**Monsieur Benoît Leblanc
Membre
Département de biologie**

**Professeur Nicolas Gévry
Président rapporteur
Département de biologie**

SOMMAIRE

La chromatine est une structure composée d'ADN et de protéines, principalement des histones, permettant la compaction du génome à l'intérieur du noyau des cellules eucaryotes. Cette compaction de l'ADN, bien qu'essentielle, représente dans un même temps une barrière à plusieurs processus cellulaires exigeant un accès à l'ADN, dont la transcription génique. L'échange d'histones canoniques par des variants d'histones, tel H2A.Z, est un des moyens utilisés par les cellules pour reconfigurer la chromatine, et ainsi contrôler l'expression des gènes.

Connaître les interactions protéiques de H2A.Z est donc une façon de mieux comprendre cette histone, mais également les mécanismes de transcription génique. Dans ce but, nous avons utilisé et optimisé une méthode basée sur une purification par affinité en tandem de protéines complexées à H2A.Z sur la chromatine, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les partenaires protéiques de H2A.Z isolés de cette façon ont par la suite pu être identifiés à l'aide de la spectrométrie de masse, et c'est ainsi que la protéine Hsm3 a été relevée.

La protéine Hsm3 était déjà connue comme étant importante pour la réparation des bases mal appariées, ainsi que comme chaperonne dans l'assemblage de la base de la sous-unité 19S du protéasome, mais aucun rôle en transcription ne lui était jusqu'à présent associé. Nous avons tenté de mieux caractériser cette protéine en construisant une souche de levure n'exprimant plus le gène *HSM3*, puis en faisant des essais de croissance avec cette souche sur différents milieux. Ceci nous a permis de constater que Hsm3 est importante pour la croissance des cellules sur un milieu contenant de la caféine. À l'aide d'autres immunoprécipitations, nous avons par la suite pu confirmer l'interaction de cette protéine avec les histones H2A et H2A.Z sur la chromatine. Des essais d'expression ont finalement démontré la nécessité de Hsm3 pour l'induction de l'expression des gènes *INO1*, *SUC2*, *GAL1* et *GAL10*, mais seulement sous certaines conditions de croissance.

Puisque cette protéine était déjà connue en tant que chaperonne du protéasome, nous avons vérifié si les phénotypes associés à la suppression de Hsm3 provenaient seulement d'un retard dans l'assemblage de ce complexe. Pour ce faire, nous avons comparé les effets de l'inactivation du protéasome à une suppression de Hsm3 sur l'induction de l'expression des gènes, mais nos résultats ne nous ont pas permis de confirmer ni d'infirmer cette hypothèse.

En conclusion, la protéine Hsm3 interagit directement avec la chromatine, et est impliquée dans certains mécanismes de transcription génique, cette implication étant fortement dépendante des conditions de croissance utilisées.

Mots-clés : H2A.Z, Hsm3, *Saccharomyces cerevisiae*, transcription, expression, gène, histone

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Luc Gaudreau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour les conseils et le soutien financier prodigués tout au long de ma maîtrise. Merci à mes conseillers, Viktor Steimle et Nicolas Gévry, et à tous les membres du laboratoire, présents et passés, pour leurs conseils, leur patience et les nombreuses discussions.

Enfin, un merci aux Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1
1.1 La transcription génique	1
1.2 La chromatine	3
1.3 Modifications de la chromatine	6
1.3.1 Modifications post-traductionnelles des histones.....	6
1.3.2 Complexes dépendants de l'ATP	8
1.3.3 ARN non codants	11
1.3.4 Variants d'histones	12
1.3.4.1 Variants de l'histone H3	13
1.3.4.1.1 Variant CENP-A.....	13
1.3.4.1.2 Variant H3.3	14
1.3.4.1.3 Autres variants de H3	15
1.3.4.2 Variants de l'histone H2A	15
1.3.4.2.1 Variant H2A.X.....	15
1.3.4.2.2 Variant H2A.Z.....	17
1.3.4.2.3 Autres variants de H2A	18
1.3.4.3 Variants de l'histone H2B	19
1.3.4.4 Variants de l'histone H1	19
1.4 Le protéasome.....	20
1.4.1 Structure et composition du protéasome	20
1.4.2 Fonction protéolytique du protéasome	22
1.4.3 Fonction transcriptionnelle du protéasome	23

1.5 La protéine Hsm3	24
CHAPITRE 2. Identification de nouveaux partenaires protéiques des histones H2A et H2A.Z associées à la chromatine.....	28
2.1 Matériels et méthodes	28
2.1.1 Plasmides et souches de levure.....	28
2.1.2 Purification de complexes associés à la chromatine.....	29
2.1.3 Essais de croissance avec les souches mutées pour les gènes codant pour les candidats identifiées par spectrométrie de masse	31
2.2 Résultats.....	32
2.2.1 Construction de souches de levure utilisées pour les immunoprécipitations	32
2.2.2 Purification et identification de partenaires protéiques de H2A et H2A.Z associés à la chromatine	33
2.2.3 Essais de croissance.....	38
2.2.4 Vérification de l'interaction de Hsm3 avec la chromatine	41
CHAPITRE 3. La protéine Hsm3 est nécessaire pour l'induction de l'expression de certains gènes... ..	43
CHAPITRE 4. DISCUSSION	61
CHAPITRE 5. CONCLUSION	67
BIBLIOGRAPHIE	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAA : *ATPases associated with various cellular activities*
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARN : acide ribonucléique
ARNnc : ARN non codant
AT: adénine et thymine
ATP : adénosine triphosphate
BP1 : *base precursor 1*
C-terminal : carboxy-terminal
CAF-1 : *chromatin assembly factor 1*
CENP-A : *histone H3-like centromeric protein A*
CHD : *chromodomain, helicase, DNA binding*
CP : *core particle* (cœur catalytique)
CTD : *C-terminal domain* (domaine C-terminal)
DO₆₀₀ : longueur d'onde de 600 nm
GTF : *general transcription factor* (facteur général de transcription)
HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histone déacétylase
HDM : histone déméthylase
HIRA : *histone regulator A*
HMT : histone méthyltransférase
HSA : *helicase-SANT-associated*
Hsm : *high spontaneous mutagenesis*
INO80 : *inositol requiring 80*
ISW1 : *imitation switch*
K : lysine
MAP : *mitogen-activated protein*

mCHIP : *modified chromatin immunoprecipitation* (immunoprécipitation modifiée de la chromatine)

MNase : *micrococcal nuclease* (nucléase micrococcale)

N-terminal : amino-terminal

NFR : *nucleosome-free region* (région sans nucléosome)

PCR : *polymerase chain reaction* (réaction en chaîne par polymérase)

ROS : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

RP : *regulatory particle* (complexe régulateur)

RSC : *remodels structure of chromatin*

S : sérine

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SWI/SNF : *switching defective/sucrose nonfermenting*

SWR1 : *sick with rat8 ts 1*

TBP : *TATA binding protein*

TFII : *transcription factor, class II genes* (facteur de transcription, gènes de classe II)

TGS : *transcriptional gene silencing*

TRBP2 : *TAR-RNA binding protein 2*

Y : tyrosine

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

- 1. Souches de levure29
- 2. Candidats identifiés par spectrométrie de masse et retenus pour analyses subséquentes38

CHAPITRE 3

- 3. *Yeast strains used in this study*.....48

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

1. Représentation des différents niveaux de compaction de la chromatine.....	4
2. Représentation schématique d'un nucléosome.....	5
3. Représentation schématique du protéasome 26S eucaryote.....	21
4. Modèle d'assemblage du complexe régulateur du protéasome, avec les chaperonnes de la base du complexe régulateur	26
5. Représentation schématique des structures secondaires de H2A et H2A.Z	27

CHAPITRE 2

6. H2A-HBH et H2A.Z-HBH sont exprimés dans les souches VGY001 et VGY002, respectivement.....	33
7. Étiquette HBH	34
8. La purification du complexe protéique comportant H2A-HBH est efficace.....	35
9. Une digestion de 90 minutes avec la MNase est nécessaire pour assurer la présence d'une majorité de mononucléosomes	36
10. Protéines immunoprécipitées avec H2A-HBH, avec H2A.Z-HBH, ou de façon non spécifique.....	37
11. Une mutation pour <i>hsm3</i> affecte la croissance des cellules sur un milieu contenant de la caféine.....	40
12. Hsm3 est immunoprécipité avec H2A-HBH et avec H2A.Z-HBH à la chromatine	42

CHAPITRE 3

13. <i>The hsm3Δ strain exhibits distinct growth phenotypes</i>	50
---	----

14. <i>Induction of INO1 expression depends on Hsm3, but its importance varies with growth conditions</i>	51
15. <i>Induction of GAL1, GAL10 and SUC2 gene expression depends on Hsm3, but its importance varies with growth conditions</i>	54
16. <i>Induction of INO1 gene expression depends on the proteasome, but its importance varies with growth conditions</i>	55

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La transcription génique

Toutes les cellules d'un organisme multicellulaire possèdent un bagage génétique identique (à quelques exceptions près), leur dissemblance étant plutôt due à une régulation distincte de l'expression de leurs gènes, particulière à chaque type cellulaire. Le contrôle de cette expression, et donc de la transcription génique, se doit d'être strict et spécifique, sans quoi la survie, le développement et le bon fonctionnement de ces cellules ne seraient possibles. Plusieurs moyens ont donc été mis en place par l'évolution pour utiliser de façon optimale le matériel génétique, et ce, en fonction de l'environnement des cellules.

La transcription génique est un mécanisme par lequel, à partir d'une séquence d'ADN, un brin complémentaire d'ARN est créé. Ce processus est catalysé par des enzymes nommées ARN polymérases. Chez les eucaryotes, si le gène transcrit code pour une protéine (gène de classe II), c'est l'ARN polymérase II, un complexe composé de douze sous-unités, qui est responsable de transcrire cet ADN en ARN messager. Le niveau de transcription est contrôlé, entre autres, par des facteurs de transcription qui reconnaissent et lient de façon spécifique des séquences d'ADN régulatrices. Ces séquences, situées aux promoteurs des gènes, sont reconnues par des facteurs de transcription de base, qui recrutent l'ARN polymérase, et ainsi initient la transcription. Plus précisément, les régions promotrices contiennent des séquences conservées, dont l'une des plus connues est la boîte TATA. La protéine TBP (*TATA binding protein*), faisant elle-même généralement partie du facteur de transcription TFIID, est connue pour s'y lier. Mis à part ce dernier, cinq autres facteurs généraux de transcription (les GTFs), tous nommés *TFII* (*transcription factor, class II genes*) suivi d'une lettre particulière (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH), l'ARN polymérase, ainsi que le complexe Médiateur, peuvent se combiner au promoteur pour former le complexe de pré-élongation (PEC) et ce, peu importe si le promoteur contient ou non une boîte TATA. Cependant, seul un niveau modéré

de transcription est activé par le PEC seul. C'est pourquoi d'autres protéines, nommées activateurs ou répresseurs, parfois également associées à des co-activateurs ou des co-répresseurs, participent au contrôle du niveau de transcription.

Le Médiateur est un complexe généralement composé de 26 sous-unités, mais qui peut toutefois avoir une structure et une composition distinctes selon le promoteur auquel il est lié (Meyer et al., 2010; Taatjes, 2010). Il participe au recrutement et à la stabilité de l'ARN polymérase II (Baek et al., 2006; Cantin et al., 2003), mais peut aussi, à l'inverse, bloquer l'assemblage de l'ARN polymérase II et inhiber la transcription en se liant à CDK8, un sous-module pouvant se lier de façon réversible au Médiateur (Knuesel et al., 2009; Taatjes et al., 2002). Bien qu'il participe au maintien d'une transcription basale et ce, indépendamment des activateurs (Baek et al., 2002; Mittler et al., 2001), le Médiateur agit également comme co-activateur, puisqu'il peut être recruté par des activateurs à différents sites de régulation, de façon gène-spécifique (Chen et al., 2006; Yang et al., 2006). Par exemple, il a récemment été démontré que la cohésine interagit avec le Médiateur aux amplificateurs et promoteurs de certains gènes actifs dans des cellules souches embryonnaires, et que ces complexes contribuent au recouvrement entre l'amplificateur et le promoteur de ces gènes, contrôlant ainsi leur expression (Kagey et al., 2010). De plus, le Médiateur joue un rôle tant dans les événements pré que post-initiation, puisque le sous-module CDK8 semble aussi assister la régulation de l'élongation et la phosphorylation du CTD (domaine C-terminal, ou carboxy-terminal), une extension annexée à la section C-terminale de l'ARN polymérase II (Donner et al., 2010).

De plus, certains facteurs de transcription peuvent lier d'autres séquences régulatrices, les amplificateurs et les silenceurs, ceux-ci pouvant être situés à des milliers de paires de bases du gène, tant en amont qu'en aval. Alors que les promoteurs permettent d'initier un faible niveau de transcription et de déterminer le site d'initiation de la transcription, les amplificateurs servent à augmenter l'amplitude de la transcription, les silenceurs à la diminuer, ces deux

dernières catégories de séquences d'ADN rendant ainsi l'expression des gènes spécifique aux conditions cellulaires (Lee and Young, 2000; Naar et al., 2001; Venters and Pugh, 2009).

1.2 La chromatine

Les cellules eucaryotes possèdent une importante quantité de matériel génétique qui doit être retenue dans l'espace restreint de leur noyau (Timmermann et al., 2001). Les cellules humaines, par exemple, parviennent à compresser 2 m d'ADN dans un noyau d'environ 15 μm . Pour ce faire, plusieurs niveaux de compaction du génome sont requis, le premier étant l'enroulement de l'ADN autour de protéines nommées histones, et configurées en une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre (figure 1). La conformation exacte que prend cette fibre est encore débattue, certains proposant une structure en solénoïde, alors que d'autres suggèrent plutôt une forme d'hélice en zigzag (Bradbury, 2002). Il est par contre bien accepté qu'elle adopte une structure super-enroulée, grâce à des interactions entre fibres de chromatine sur de longues distances, ainsi qu'à diverses protéines non-histones, ce qui permet un niveau de compaction encore plus élevé.

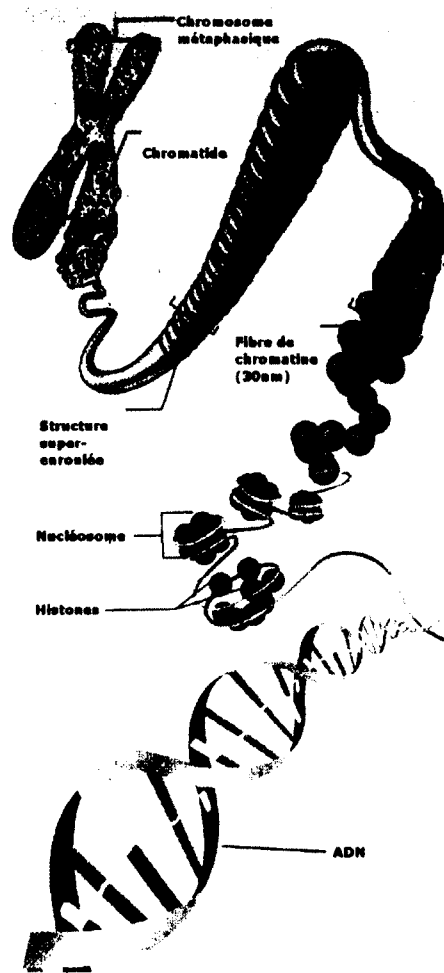


Figure 1. Représentation des différents niveaux de compaction de la chromatine (tiré et modifié de Saladin, 1998).

Cette compaction varie selon les conditions de la cellule et la région chromosomique. En effet, la fibre de chromatine se compresse de façon maximale au cours de la métaphase, moment où les chromosomes se condensent à l'équateur de la cellule. De plus, les régions d'euchromatine sont dans un état moins condensé et sont plus actives au niveau transcriptionnel que les zones d'hétérochromatine (Moazed, 2001). Ces dernières, principalement retrouvées aux centromères et aux télomères, possèdent des histones hypoacétylées et hyperméthylées (H3K9me), ce qui permet le recrutement de divers facteurs, dont des protéines de la famille HP1 (Grewal and Jia, 2007; Jenuwein and Allis, 2001; Rusche et al., 2003). En plus d'avoir un

rôle au niveau de la régulation de l'expression des gènes, l'hétérochromatine est essentielle à la stabilité des génomes, à la différenciation cellulaire, et au *silencing* transcriptionnel et posttranscriptionnel des éléments d'ADN répétitifs (Grewal and Jia, 2007).

La chromatine est caractérisée par une répétition de nucléosomes, complexes protéiques agencés en une structure en « collier de perles », et autour desquels s'enroulent ~147 paires de bases, ou ~1,65 tour d'ADN (figure 2) (Luger et al., 1997; Olins and Olins, 1974; Woodcock et al., 1976). Les nucléosomes sont constitués d'un octamère d'histones comprenant deux dimères H2A-H2B et un tétramère 2[H3-H4], et sont espacés d'environ 165 paires de bases chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Des histones de liaison, ou histones H1, sont associées à l'ADN de liaison situé entre chaque nucléosome. Elles scellent l'ADN à son site d'entrée/sortie du nucléosome, et stabilisent ainsi la position du nucléosome et la conformation de la chromatine (Allan et al., 1980; Noll and Kornberg, 1977; Zhou et al., 1998). D'autres protéines non-histones peuvent également se retrouver sur l'ADN, et aider à définir la structure et la fonction de la chromatine associée (Adkins et al., 2004).

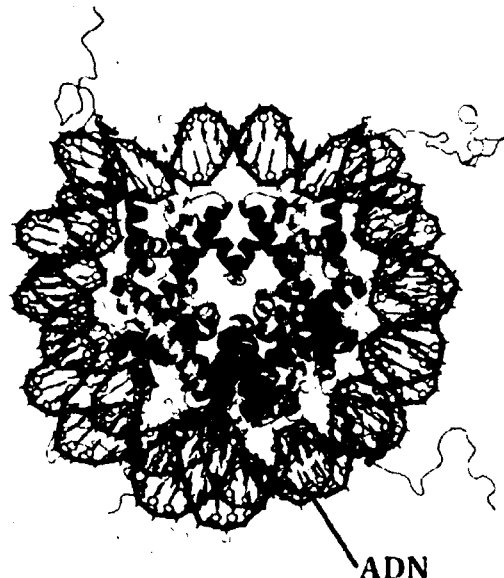


Figure 2. Représentation schématique d'un nucléosome (tiré et modifié de Wheeler, 2007).

1.3 Modifications de la chromatine

En plus d'être essentielle pour la compaction du génome, la présence de la chromatine permet de garder le contrôle sur plusieurs processus cellulaires exigeant un accès à l'ADN, comme la transcription génique, la recombinaison, la réparation ou la réplication de l'ADN (Luger et al., 1997). Pour permettre l'accès, par exemple, de la machinerie transcriptionnelle et des régulateurs de la transcription à l'ADN, et par conséquent, un contrôle de l'expression des gènes, la chromatine doit être reconfigurée. Plusieurs mécanismes ont donc été développés par les cellules eucaryotes pour modifier les propriétés de la chromatine, dans le but d'activer ou de réprimer la transcription en réponse aux conditions de la cellule. Ceux-ci comprennent l'ajout de modifications post-traductionnelles sur les histones, le remodelage de la chromatine par des complexes dépendants de l'ATP (adénosine triphosphate), la restructuration de la chromatine par des ARNnc (non codants), ainsi que l'échange d'histones canoniques par des variants d'histone. Ces processus sont davantage détaillés ci-après.

1.3.1 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont de petites protéines (11-22 kDa) basiques très conservées à travers les espèces, possédant un domaine globulaire *histone-fold*, composé de trois hélices α , et bordé par des domaines N-terminal (amino-terminal) et C-terminal (carboxy-terminal) (Luger et al., 1997; McGhee and Felsenfeld, 1980). Des modifications post-traductionnelles sont retrouvées sur ces extrémités, principalement au niveau des queues N-terminales (Berger, 2002; Strahl and Allis, 2000). En effet, celles-ci émergent à l'extérieur de la structure globulaire du nucléosome, permettant leur accès aux complexes responsables de ces modifications.

Jusqu'à maintenant, huit types de modifications post-traductionnelles ont été retrouvés présents sur les extrémités des histones, la majorité ayant été observés comme étant des marques dynamiques et réversibles : la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la déimination, la sumoylation, l'ADP-ribosylation et l'isomérisation des

prolines. Plusieurs enzymes ont déjà été identifiées comme étant responsables de ces modifications. Leur présence peut entraîner une altération des interactions des nucléosomes avec d'autres complexes protéiques, et un changement dans l'accessibilité de l'ADN pour divers processus cellulaires, comme la transcription, la réparation, la réplication et la condensation de l'ADN (Cheung et al., 2000; Geiman and Robertson, 2002; Irvine et al., 2002; Nacheva et al., 1989; Peterson and Laniel, 2004).

Les principales modifications retrouvées sur les queues d'histone sont l'acétylation et la méthylation. Chez la levure, les lysines 4, 36 et 79 sur l'histone H3, et la lysine 20 sur l'histone H4 peuvent être mono-, di- ou triméthylées, et la déposition de cette marque est principalement couplée à la transcription (Garcia et al., 2007; Millar and Grunstein, 2006). L'activité antagoniste des complexes histone méthyltransférases (HMTs) et histone déméthylases (HDMs) contrôle l'ajout ou le retrait de ces groupements méthyles (Kouzarides, 2007). En ce qui concerne l'acétylation, différents complexes histone acétyltransférases (HATs) et histone déacétylases (HDACs) ont également été identifiés comme régulateurs de cette modification sur certaines lysines des histones H2A, H3 et H4.

Plus de 60 sites de modification post-traductionnelle sur les histones ont été identifiés jusqu'à présent, mais étant donné le nombre de nouveaux sites de modification trouvés chaque année, ce chiffre ne représente probablement qu'une fraction de tous les résidus d'histones pouvant réellement être modifiés. Puisqu'une immense variété de combinaisons de modifications post-traductionnelles est possible, un « code d'histone » a été proposé, suggérant que chaque combinaison entraîne ou inhibe le recrutement à la chromatine de protéines spécifiques (Jenuwein and Allis, 2001; Lee et al., 2010; Turner, 2000, 2002). Ces dernières peuvent à leur tour recruter d'autres protéines (par exemple, des complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP), entraîner d'autres modifications sur le même ou sur un autre nucléosome, ou modifier la structure de la chromatine (Fillingham and Greenblatt, 2008; Jenuwein and Allis, 2001; Klose and Zhang, 2007). Ce système est en plus davantage complexifié par l'existence de deux niveaux de lecture du code d'histone, l'un à long et l'autre

à court terme (Turner, 2007). En effet, certaines modifications sont conservées au cours des divisions cellulaires, et font donc partie de la mémoire épigénétique des cellules (Fischle et al., 2005; Hake and Allis, 2006; Heard, 2005; Mateescu et al., 2004; Peters et al., 2003). D'autres, au contraire, sont acquises ou retirées de façon rapide et réversible en réponse aux changements dans la cellule, permettant ainsi un contrôle approprié des fonctions cellulaires reliées à l'ADN, comme la transcription génique (Cheung et al., 2000; Hazzalin and Mahadevan, 2005; Irvine et al., 2002; Klose and Zhang, 2007; Metivier et al., 2003; Nightingale et al., 2006).

1.3.2 Complexes dépendants de l'ATP

De façon générale, les nucléosomes doivent être reconfigurés lors de processus cellulaires exigeant un accès à l'ADN, comme la réparation, la recombinaison et la transcription. Il existe donc des complexes capables d'utiliser l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour faire glisser, éjecter ou restructurer la composition des nucléosomes, rendant ainsi l'ADN correspondant davantage exposé ou moins exposé, selon le besoin (Becker and Horz, 2002; Saha et al., 2006). D'autres complexes sont aussi nécessaires pour replacer correctement les nucléosomes après la réplication de l'ADN (Polo and Almouzni, 2006).

Les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP ont certaines propriétés en commun : une affinité pour l'ADN et les nucléosomes, la capacité de reconnaître les modifications post-traductionnelles des histones, un domaine ATPase nécessaire au bris du contact entre l'ADN et les histones, un domaine ou une protéine régulant le domaine ATPase, ainsi qu'un domaine ou une protéine contrôlant les contacts avec d'autres facteurs de chromatine ou de transcription. L'ensemble de ces propriétés leur donne la capacité de changer la structure de la chromatine, et d'ainsi influencer la transcription (Clapier and Cairns, 2009).

Ces complexes peuvent être catégorisés en quatre grandes familles, conservées chez tous les eucaryotes. Les quatre modifient l'interaction entre les nucléosomes et l'ADN, mais chacune possède des fonctions, des domaines et des sous-unités qui lui sont propres. Les complexes de la famille SWI/SNF (*switching defective/sucrose nonfermenting*), comprenant SWI/SNF et RSC (*remodels structure of chromatin*) chez la levure, peuvent faire glisser ou éjecter des nucléosomes, étape nécessaire à différents processus cellulaires (Hirschhorn et al., 1992; Lorch et al., 2006). Ceux de la famille ISW1 (*imitation switch*) contrôlent l'espacement entre les nucléosomes lors de l'assemblage de la chromatine ou d'une répression de la transcription (Fazzio et al., 2001). Les complexes ISW1a, ISW1b et ISW2 de levure font partie de cette famille. Les nucléosomes peuvent également être déplacés ou éjectés pour activer ou réprimer la transcription, grâce au complexe CHD (*chromodomain, helicase, DNA binding*), de la famille du même nom. La quatrième famille, INO80 (*inositol requiring 80*), est associée à plusieurs fonctions. Le complexe INO80 est nécessaire, entre autres, pour l'activation de la transcription et la réparation de l'ADN (Shen et al., 2000; Shimada et al., 2008). SWR1 (*sick with rat8 ts 1*), de la même famille, est particulier, puisqu'il restructure les nucléosomes en enlevant les dimères H2A-H2B et en les remplaçant par des dimères H2A.Z-H2B (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005b; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Tous ces complexes ont en commun une sous-unité ATPase de la famille SWI2/SNF2, composée d'un domaine ATPase séparé en deux parties, nommées DExx et HELICc. Des domaines protéiques particuliers à chacune des familles de complexes de remodelage de la chromatine ont été identifiés et sont situés entre ces deux parties (DExx et HELICc), ou près de ce domaine ATPase, certains de ces domaines servant à réguler les fonctions du complexe, d'autres lui permettant de reconnaître les nucléosomes ou les modifications sur les histones. Parmi ceux-ci, les bromodomaines, qui reconnaissent les groupements acétyles sur les lysines des histones, sont typiques à la famille SWI/SNF (Hassan et al., 2002; Kasten et al., 2004; Zhang et al., 2005). Il n'est toutefois pas encore complètement compris si ce domaine est important pour le ciblage et/ou l'efficacité de ces complexes (Carey et al., 2006; Ferreira et al., 2007). Les complexes de la famille CHD possèdent, quant à eux, des chromodomaines en

tandem servant à cibler les lysines méthylées des histones (Brehm et al., 2004; Flanagan et al., 2005; Sims et al., 2005). De plus, il existe un domaine HSA (*helicase-SANT-associated*) permettant aux complexes de la famille SWI/SNF et INO80 de se lier à la chromatine (Szerlong et al., 2008). Finalement, la famille ISW1 est reconnue comme possédant une combinaison de deux domaines, SANT-SLIDE, importante pour la liaison aux histones, à l'ADN, ainsi qu'au contrôle de l'activité ATPase de ces complexes (Boyer et al., 2004; Grune et al., 2003). Comme ces complexes peuvent posséder plus d'un domaine de reconnaissance des histones à la fois, différentes combinaisons de domaines leur permettent de cibler correctement la bonne région de chromatine.

Les complexes de remodelage de la chromatine ont principalement été étudiés pour leur rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Comme ils sont nécessaires tant pour l'assemblage que pour la désorganisation de la chromatine, ils permettent la transition d'un état de transcription active à un état réprimé, et vice versa. Certains complexes agissent comme répresseurs, puisqu'ils aident à l'assemblage des nucléosomes, empêchent l'accès à l'ADN, enlèvent les facteurs de liaison à l'ADN, ou attirent d'autres complexes pouvant renforcer cette répression (Burgio et al., 2008; Goldmark et al., 2000). D'autres complexes de remodelage sont plutôt activateurs. Ils déplacent, restructurent ou éjectent les nucléosomes aux promoteurs pour exposer l'ADN correspondant, ce qui permet la liaison d'activateurs de transcription ou de la machinerie transcriptionnelle (Armstrong et al., 2002; Yudkovsky et al., 1999). Le passage de l'ARN polymérase II lors de l'élongation est également possible grâce au remodelage des nucléosomes au sein de la région codante des gènes (Carey et al., 2006; Mas et al., 2009; Schwabish and Struhl, 2004; Simic et al., 2003; Srinivasan et al., 2005).

Comme ces complexes servent à contrôler tant l'organisation que l'accessibilité et la structure de la chromatine, cela leur confère un rôle essentiel, non seulement au niveau de la régulation de la transcription, mais aussi pour l'assemblage de la chromatine lors de la réplication (Polo and Almouzni, 2006), la compensation du dosage du chromosome X (Badenhorst et al., 2002; Deuring et al., 2000; Dorigo et al., 2003; Shogren-Knaak et al., 2006), la formation de

domaines chromosomiques (Yasui et al., 2002), la réplication de l'ADN (Biswas et al., 2008; Collins et al., 2002; Flanagan and Peterson, 1999; Li et al., 2005c; Poot et al., 2004; Shimada et al., 2008; Simpson, 1990; Vincent et al., 2008; Zhou et al., 2005), la réparation et la recombinaison de l'ADN (Chai et al., 2005; Morrison et al., 2004; van Attikum et al., 2007; Xiao et al., 2009), la ségrégation des chromosomes (Hsu et al., 2003; Huang and Laurent, 2004; Yu et al., 2007), un bon développement des organismes multicellulaires (Badenhorst et al., 2002; Kehle et al., 1998; Mohrmann and Verrijzer, 2005; Wysocka et al., 2006) et la différenciation cellulaire (de la Serna et al., 2001; Fujita et al., 2004; Kaji et al., 2006; Lessard et al., 2007). Différentes maladies reliées au développement (Kitagawa et al., 2003; Vissers et al., 2004; Woudstra et al., 2002; Xue et al., 2003), ainsi que certains types de cancer (Wang et al., 2007), ont par ailleurs été associés à des mutations affectant le fonctionnement de ces complexes.

1.3.3 ARN non codants

Des mécanismes de régulation transcriptionnelle impliquant des ARNnc ont été observés tant chez des organismes unicellulaires (*Schizosaccharomyces pombe* et *Tetrahymena thermophila*) que chez des organismes plus complexes (*Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et dans des cellules humaines) (Moazed, 2009; Morris et al., 2004; Verdel et al., 2009). Ces ARN peuvent entraîner une modification de la conformation de la chromatine, de la méthylation de l'ADN et des modifications sur les histones, provoquant ainsi un changement dans l'expression des gènes. Les marques répressives H3K9me2 (diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3) et H3K27me3 sont celles souvent retrouvées aux promoteurs des loci visés lors d'un *silencing* transcriptionnel par ces ARN (aussi nommé *transcriptional gene silencing*, ou *TGS*) (Buhler et al., 2005; Gonzalez et al., 2008; Han et al., 2007; Hawkins et al., 2009; Kim et al., 2008; Kim et al., 2006; Morris et al., 2004; Suzuki et al., 2008; Turner et al., 2009; Weinberg et al., 2006). Les protéines Ago1 (*argonaute 1*) (Gonzalez et al., 2008; Hawkins et al., 2009; Janowski et al., 2006; Kim et al., 2008; Kim et al., 2006; Suzuki et al., 2008; Turner et al., 2009), Ago2 (Gonzalez et al., 2008;

Janowski et al., 2006), TRBP2 (*TAR-RNA binding protein 2*) (Kim et al., 2006), HDAC1 (Hawkins et al., 2009; Suzuki et al., 2008; Turner et al., 2009), ainsi que les méthyltransférases Dnmt3 A (Hawkins et al., 2009; Turner et al., 2009; Weinberg et al., 2006), KMT6 (Kim et al., 2006; Turner et al., 2009) et KMT1C (Hawkins et al., 2009), ont été identifiées comme étant impliquées dans différents processus de TGS dans les cellules humaines.

Les ARNnc sont importants pour plusieurs processus, comme l'activité et l'inhibition des transposons, la variégation par effet de position, les paramutations, le *silencing* des régions d'hétérochromatine, ainsi que pour d'autres mécanismes requérant des modifications épigénétiques. Par exemple, c'est l'ARNnc XIST, de concert avec certaines protéines, qui est responsable de l'inactivation d'un chromosome X lors de la compensation du dosage chez les mammifères (Chang et al., 2006). De plus, l'ARNnc HOTAIR est essentiel au *silencing* de certaines régions chromosomiques en *trans*, via une modification des histones (Rinn et al., 2007). La présence d'une transcription anti-sens à une grande quantité de gènes, dont certains gènes suppresseurs de tumeurs, souligne également l'importance de ces ARN dans la régulation de l'expression.

1.3.4 Variants d'histones

L'ADN chez les eucaryotes s'enroule autour de nucléosomes, complexes généralement composés de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 (Luger et al., 1997). La transcription des gènes codant pour ces protéines est intimement liée à la réplication de l'ADN. Il existe par ailleurs des gènes codant pour des histones non-canoniques, et qui sont exprimés tout le long du cycle cellulaire (Ausio and Abbott, 2002). Des variants pour chacune des histones canoniques, sauf H4, ont déjà été identifiés. Ces variants d'histones diffèrent des histones canoniques par leurs séquences d'acides aminés et leurs fonctions. L'échange d'une histone de base par un de ces variants au sein d'un nucléosome est un moyen utilisé par les

cellules pour changer la structure et la stabilité d'un nucléosome, et par conséquent, redéfinir une région de chromatine.

1.3.4.1 Variants de l'histone H3

Parmi les variants les plus conservés à travers les espèces, et donc les plus essentiels, sont retrouvés CENP-A (*histone H3-like centromeric protein A*; aussi connu sous le nom de CenH3) et H3.3, paralogues de l'histone H3.

1.3.4.1.1 Variant CENP-A

CENP-A est retrouvé au sein de nucléosomes situés aux centromères des chromosomes et ce, chez la majorité des eucaryotes. Il est nécessaire à l'assemblage des kinétochores, structures permettant l'attachement des microtubules aux centromères durant la ségrégation des chromosomes (Black and Bassett, 2008; Cheeseman and Desai, 2008; Santaguida and Musacchio, 2009). Cette protéine est donc considérée comme une marque épigénétique du centromère (Allshire and Karpen, 2008). CENP-A possède 50 à 60 % d'homologie avec H3 au niveau de leurs domaines *histone fold*, mais leurs queues N-terminales diffèrent fortement. Un motif permettant la liaison des sillons mineurs de l'ADN et ayant de l'affinité pour les séquences riches en AT est présent à cette extrémité N-terminale, ce qui concorde avec la préférence de cette histone pour les centromères, souvent riches en AT (Churchill and Suzuki, 1989; Malik et al., 2002). Les nucléosomes CENP-A ont aussi la particularité d'induire un supertour positif de l'ADN, entraînant ainsi un enroulement droit de l'ADN autour de ces nucléosomes (Furuyama and Henikoff, 2009), au lieu de l'enroulement gauche habituellement retrouvé autour des octamères d'histones canoniques (Luger et al., 1997).

Chez *S. cerevisiae*, l'histone centromérique se nomme Cse4 (Sanyal et al., 2004; Stoler et al., 1995), et un seul nucléosome par centromère le contient (Furuyama and Biggins, 2007; Meluh et al., 1998). Cse4 a été identifié comme interagissant avec la protéine Scm3 (Camahort et al.,

2007; Mizuguchi et al., 2007; Stoler et al., 2007), qui peut déplacer les histones H2A et H2B de ces nucléosomes *in vitro*, formant ainsi un *hémisome* (Mizuguchi et al., 2007). Cette configuration en hémisome est probablement ce qui permet l'enroulement droit de l'ADN autour de ces nucléosomes (Furuyama and Henikoff, 2009). Alors que Cse4 est incorporé à la chromatine préférentiellement au moment de la réplication de l'ADN (Pearson et al., 2004), CENP-A est plutôt déposé durant la fin de la phase de la mitose et en G1 chez l'humain (Hemmerich et al., 2008; Jansen et al., 2007).

1.3.4.1.2 Variant H3.3

Le variant d'histone H3.3, quant à lui, possède beaucoup d'homologie avec H3, avec seulement quatre acides aminés divergeant d'une histone à l'autre chez l'humain, leur dissemblance se situant plutôt au niveau de leurs modifications post-traductionnelles (Hake et al., 2006). Alors que H3 est incorporé à la chromatine par le complexe CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*), H3.3 l'est par le complexe HIRA (*histone regulator A*) (Tagami et al., 2004) et ce, indépendamment de la synthèse de l'ADN (Orsi et al., 2009). Son incorporation est couplée à l'induction de la transcription et à l'élongation (Schwartz and Ahmad, 2005; Sutcliffe et al., 2009), et est accompagnée de changements dans les modifications post-traductionnelles des histones (Sutcliffe et al., 2009). Ce variant est habituellement retrouvé aux gènes possédant une haute activité transcriptionnelle, aux promoteurs de gènes actifs et aux éléments régulateurs (Henikoff, 2008). Les variants H3.3 sont d'ailleurs enrichis en modifications associées à l'activation des gènes, comme l'hyperacétylation et la diméthylation de K36 et K79 (Ahmad and Henikoff, 2002; Chow et al., 2005; Johnson et al., 2004; McKittrick et al., 2004). Les nucléosomes H3.3 sont donc considérés comme une mémoire épigénétique d'un état de chromatine active (Ng and Gurdon, 2005). De plus, ceux-ci semblent être moins stables et sont retirés plus rapidement de la chromatine que les nucléosomes canoniques (Henikoff, 2008). En effet, ils se séparent plus facilement des dimères H2A-H2B lors d'une dissociation par des sels (Jin and Felsenfeld, 2007). La présence de H3.3 semble donc déstabiliser les nucléosomes, ce qui facilite l'accessibilité à la chromatine et le

recrutement des complexes de modification des histones (Sutcliffe et al., 2009). Cette histone est également impliquée dans certains mécanismes de remodelage uniques aux cellules germinales (Ooi and Henikoff, 2007). Plus précisément, lors du *silencing* de la chromatine durant la première méiose des spermatides, un remplacement intensif des nucléosomes H3 par ceux H3.3 est nécessaire (van der Heijden et al., 2007). Chez la levure, une seule forme de H3 non centromérique existe, qui se rapproche davantage du H3.3 que du H3 des eucaryotes plus complexes, et son incorporation est possible tant durant qu'en dehors de la réplication (Mousson et al., 2007).

1.3.4.1.3 Autres variants de H3

Chez les eucaryotes supérieurs, on peut également retrouver le variant d'histone H3.2, qui est associé au *silencing* des gènes, qui diffère de seulement un acide aminé avec H3, et qui, comme ce dernier, n'est incorporé que durant la réplication (Johnson et al., 2004; McKittrick et al., 2004). Ces organismes possèdent aussi H3.1t, qui est seulement exprimé dans les testicules, et qui a quatre acides aminés de substitués en comparaison à l'histone canonique (Luger et al., 1997).

1.3.4.2 Variants de l'histone H2A

En ce qui concerne H2A, ce sont les variants H2A.X et H2A.Z qui sont les variants les plus conservés à travers les espèces.

1.3.4.2.1 Variant H2A.X

Chez l'humain, H2A.X est similaire à H2A, mais possède une extrémité C-terminale unique, caractérisée par un motif Ser-Gln-Glu (SQE) pouvant être phosphorylé sur la sérine 139 (Malik and Henikoff, 2003; Rogakou et al., 1998). Cette forme phosphorylée de H2A.X, nommée γ -H2A.X, est abondamment recrutée à la chromatine lors d'un bris double brin de

l'ADN (Fernandez-Capetillo et al., 2003; Fillingham et al., 2006; Keogh et al., 2006; Paull et al., 2000). Chez la levure *S. cerevisiae*, il n'existe pas de variant H2A.X, et c'est plutôt H2A qui est phosphorylé (S129) et qui s'accumule aux sites de cassures double brin (Downs et al., 2000). Les bris double brin sont très toxiques pour les cellules s'ils ne sont pas réparés, puisqu'ils peuvent entraîner la perte de longs morceaux d'ADN lors de la mitose (Lieber et al., 2004). Ils apparaissent suite à une exposition à des agents externes comme des rayons infrarouges ou certains médicaments chimiothérapeutiques, ou sont causés par certains processus cellulaires comme l'arrêt des fourches de réplication de l'ADN, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par la respiration oxydative, la recombinaison méiotique, ou les réarrangements des gènes des immunoglobulines (recombinaison V(D)J) (Bassing and Alt, 2004). La phosphorylation de H2A.X permet à la chromatine d'adopter une structure plus flexible, ce qui entraîne le recrutement et l'accumulation de complexes de réparation de l'ADN et de complexes de remodelage de la chromatine aux sites de cassures (Altaf et al., 2009; Ausio et al., 2001; Downs et al., 2000; van Attikum and Gasser, 2009). La cohésine, qui maintient les chromatides sœurs ensemble au moment de la réplication, et qui est impliquée dans la réparation par recombinaison homologue des bris double brin, se localise également aux sites de cassures de façon dépendante de γ -H2A.X (Unal et al., 2004). Le résidu tyrosine Y142 de H2A.X peut aussi être phosphorylé, cette phosphorylation étant nécessaire à la formation de γ -H2A.X (Cook et al., 2009; Xiao et al., 2009). Il existe des anticorps dirigés spécifiquement contre γ -H2A.X, qui détectent des structures nommées foci γ -H2A.X, chaque focus représentant un bris double brin (Sedelnikova et al., 2003). Cette forme modifiée de H2A.X peut donc servir de marque épigénétique de dommages à l'ADN.

La forme phosphorylée de H2A.X est par ailleurs aussi retrouvée à d'autres endroits indépendamment des cassures double brin, ce qui suggère qu'elle possède d'autres rôles. Elle est en effet fonctionnellement reliée à la voie de redémarrage des fourches de réplication bloquées (Lyakhovich and Surrallès, 2007), et elle maintient la réponse aux points de contrôle du cycle cellulaire pendant que les cassures à l'ADN sont réparées (Downey and Durocher, 2006; Fillingham et al., 2006). Si les dommages à l'ADN ne sont pas réparés, les cellules

peuvent entreprendre un processus de mort cellulaire programmée dans lequel H2A.X joue également un rôle (Lu et al., 2006; Mukherjee et al., 2006). Les cellules de souris n'exprimant plus cette histone sont aussi plus sensibles aux radiations et sont moins efficaces au niveau de la réparation de l'ADN, ce qui mène à une augmentation de l'apparition d'aberrations chromosomiques dans ces cellules (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002). H2A.X permet donc de prévenir l'instabilité des chromosomes et l'apparition des cancers (Bassing et al., 2003; Celeste et al., 2003a; Celeste et al., 2003b). Ce variant est aussi impliqué dans l'apoptose (Rogakou et al., 2000), la recombinaison V(D)J (Chen et al., 2000) la recombinaison méiotique (Lewis et al., 2003; Mahadevaiah et al., 2001), la réplication (Ward and Chen, 2001) et la spermatogénèse (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002).

1.3.4.2.2 Variant H2A.Z

Le variant d'histone H2A.Z est essentiel à la survie chez la majorité des eucaryotes (Faast et al., 2001; Liu et al., 1996; Ridgway et al., 2004; van Daal et al., 1988). Il est impliqué dans une grande variété de fonctions biologiques, tels la modulation de la transcription (Adam et al., 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003; Santisteban et al., 2000), la stabilité et la ségrégation des chromosomes (Krogan et al., 2004a; Rangasamy et al., 2004), l'arrêt de l'étalement de l'hétérochromatine (Meneghini et al., 2003), et la progression à travers le cycle cellulaire (Dhillon et al., 2006). Il semble aussi être exprimé à un niveau très élevé dans certains types de cancer (Dunican et al., 2002; Gevry et al., 2007).

La présence de ce variant confère une structure particulière au nucléosome, particulièrement au niveau du domaine de liaison du tétramère 2[H3-H4] avec le dimère H2A/H2A.Z-H2B (Suto et al., 2000). Une controverse existe à propos de la stabilité des nucléosomes H2A.Z, certaines études démontrant que ceux-ci sont plus stables et plus immobiles que les nucléosomes canoniques (Li et al., 2005b; Park et al., 2004), alors que d'autres soutiennent qu'ils le sont moins (Abbott et al., 2001; Suto et al., 2000; Zhang et al., 2005).

L'incorporation de H2A.Z à la chromatine est catalysée par le complexe Swr1 chez la levure (Kobor et al., 2004; Krogan et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004) et par, au moins, les complexes SRCAP et p400 dans les cellules humaines (Gevry et al., 2007; Jin et al., 2005). Ce que ciblent exactement ces complexes n'est pas encore parfaitement défini, mais la séquence d'ADN et certaines modifications post-traductionnelles présentes sur les histones H3 et H4 semblent être importantes (Altaf et al., 2007; Gervais and Gaudreau, 2009; Li et al., 2005b; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005). Il a aussi été démontré que chez la levure, cette histone est principalement retrouvée directement en aval de la majorité des gènes de l'euchromatine, qu'ils soient actifs ou inactifs, aux promoteurs sans boîte TATA, dans les deux nucléosomes bordant les NFR (*nucleosome free region*) (Guillemette et al., 2005; Li et al., 2005b; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005), et aux régions sous-télomériques (Kobor et al., 2004; Meneghini et al., 2003; Mizuguchi et al., 2004; Zhang et al., 2004). Chez les mammifères, il est principalement associé à l'euchromatine péracentrique et silencieuse (Rangasamy et al., 2003; Swaminathan et al., 2005), et semble éviter les régions riches en ADN méthylé (Zemach et al., 2010). Il a été observé que cette histone est souvent éjectée des régions promotrices lors de l'activation du gène, probablement parce qu'elle rend les nucléosomes moins stables, et donc plus facilement éjectables, ce qui permet le recrutement de l'ARN polymérase et l'activation de la transcription (Adam et al., 2001; Barski et al., 2007; Gevry et al., 2007; Larochelle and Gaudreau, 2003; Li et al., 2005b; Santisteban et al., 2000; Schones et al., 2008; Zhang et al., 2005). Sa présence pourrait aussi servir à préparer la structure de la chromatine au recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

1.3.4.2.3 Autres variants de H2A

D'autres variants de H2A retrouvés chez les vertébrés sont macroH2A et H2a-Bbd. Le premier joue un rôle dans la répression de la transcription, l'inactivation du chromosome X et la formation de l'hétérochromatine facultative (Costanzi and Pehrson, 1998; Costanzi et al., 2000; Mermoud et al., 1999). Le second diffère fortement de H2A (Eirin-Lopez et al., 2008). Il est absent du chromosome X (Gonzalez-Romero et al., 2008), et sa présence chevauche

plutôt celle de l'histone H4 acétylée, suggérant son association avec les régions de chromatine transcriptionnellement actives (Chadwick and Willard, 2001). Les nucléosomes H2A-Bbd sont aussi plus instables que les nucléosomes canoniques, ce qui rend la fibre de chromatine plus relâchée (Bao et al., 2004; Eirin-Lopez et al., 2008).

1.3.4.3 Variants de l'histone H2B

Les seuls variants de H2B connus chez l'humain sont spécifiques aux testicules. Le premier, hTSH2B, semble déstabiliser les nucléosomes (Li et al., 2005a). Le second, H2BFWT, est fonctionnellement relié à la réorganisation de la chromatine durant les dernières étapes de la spermatogénèse, et à la formation des complexes liés aux télomères dans le sperme humain (Gineitis et al., 2000).

1.3.4.4 Variants de l'histone H1

Chez l'humain, les histones de liaison, comme les histones du cœur du nucléosome, sont composées d'un domaine globulaire bordé d'extrémités C-terminale et N-terminale, mais leur orthologue chez la levure, Hho1p, possède deux domaines globulaires (Patterton et al., 1998). Comme les autres histones, elles peuvent être modifiées post-traductionnellement, leur modification la plus étudiée étant la phosphorylation (Roth and Allis, 1992). La présence de cette dernière affaiblit la liaison de H1 à la chromatine, et a un effet sur la régulation de l'expression des gènes (Dou et al., 1999). Dix variants de H1 ont été identifiés chez la souris et l'humain, chacun possédant une spécificité tissulaire et développementale distincte. Ils détiennent un domaine central semblable, mais des extrémités divergentes. Certains variants sont exprimés exclusivement durant la réplication (H1.1 à H1.5 et H1t), alors que d'autres le sont tout le long du cycle cellulaire. Par ailleurs, certains variants de H1 (H1.2 à H1.5) sont présents dans presque toutes les cellules, alors que d'autres sont retrouvés principalement dans des cellules complètement différenciées (H1.0), ou spécifiquement dans les oocytes (H1oo) ou

les testicules (H1t et H1T2). Un dernier variant chez l'humain, H1x, a une localisation particulière, dans les nucléoles et à la périphérie des chromosomes (Stoldt et al., 2007).

1.4 Le protéasome

Les cellules doivent posséder des mécanismes fonctionnels de dégradation des protéines pour survivre, puisque des protéines mal repliées, endommagées ou en surnombre peuvent être néfastes à plusieurs processus cellulaires. Dans la majorité des cas, c'est le protéasome qui est responsable de la protéolyse (Goldberg, 2007; Wolf and Hilt, 2004).

1.4.1 Structure et composition du protéasome

Chez les eucaryotes, le protéasome 26S est l'enzyme central du système ubiquitine-protéasome (Voges et al., 1999). Il est composé d'un cœur catalytique 20S et d'un ou de deux complexes régulateurs 19S (figure 3) (Glickman et al., 1999). Le cœur catalytique 20S a la forme d'un baril, et est composé de deux anneaux heptamériques internes de sous-unités de type β , et de deux anneaux heptamériques externes de sous-unités de type α (Groll et al., 1997). Les sites protéolytiques actifs sont menés par trois des sept sous-unités β , situées dans la cavité centrale du baril. L'entrée des substrats à travers cette cavité est restreinte par une structure formée par les extrémités N-terminales des sous-unités α (Groll et al., 2000), de sorte que les protéines doivent être, au moins en partie, dépliées pour atteindre le cœur catalytique du protéasome, et ainsi y être dégradées (Johnston et al., 1995).

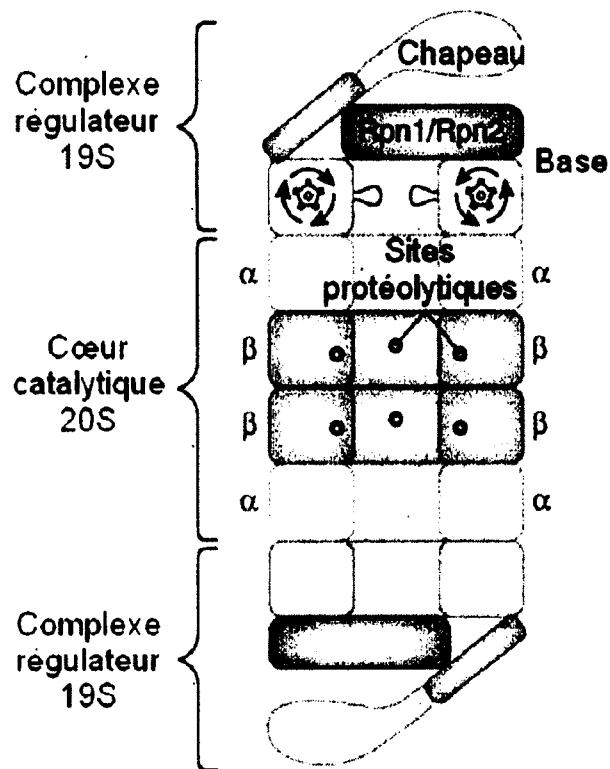


Figure 3. Représentation schématique du protéasome 26S eucaryote (tiré et modifié de Schrader et al., 2009). Les protéines d'échafaudage Rpn1 et Rpn2, les sites protéolytiques, ainsi que les boucles de l'anneau d'ATPases aidant au dépliement et à la translocation des substrats, sont indiqués. Seulement un ensemble de boucles est montré pour davantage de clarté.

Le complexe régulateur 19S est, quant à lui, nécessaire à la reconnaissance du substrat, la déubiquitination, le dépliement des protéines, leur translocation vers le canal du 20S, ainsi que pour fournir de l'ATP et des ubiquitines au cœur catalytique (Goldberg, 2007). Il est constitué de deux parties, nommées la base et le chapeau du complexe régulateur (Glickman et al., 1998a). La base est formée de six sous-unités ATPases de la famille AAA (*ATPases associated with various cellular activities*) (les sous-unités Rpt1-6 chez la levure) et de deux sous-unités non-ATPases, Rpn1 et Rpn2 (Voges et al., 1999). Les ATPases possèdent chacune une fonction qui lui est propre (Rubin et al., 1998; Smith et al., 2007), et s'assemblent en un

anneau hexamérique qui est directement lié au 20S (Smith et al., 2006). Les deux sous-unités Rpn sont caractérisées par des répétitions Arm/HEAT, qui forment des solénoïdes α (Glickman et al., 1998b; Kajava, 2002). Le chapeau du 19S contient quant à lui neuf protéines non-ATPases (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12, Rpn15/Sem1) qui sont essentielles, mais de fonction inconnue, exception faite de Rpn11, qui a une activité déubiquitinante (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002).

D'autres polypeptides ont été identifiés comme interagissant avec le protéasome de façon plus ou moins forte, ou seulement sous certaines conditions, comme Rpn10, qui joint la base au chapeau du 19S (Glickman et al., 1998a; Schmidt et al., 2005).

1.4.2 Fonction protéolytique du protéasome

Le protéasome doit être très spécifique pour éviter la destruction de protéines devant être conservées. Ce sont donc seulement les substrats qui possèdent les signaux de dégradation (ou degrons) appropriés qui sont reconnus par le protéasome. La majorité des protéines sont marquées pour la dégradation par l'attachement covalent de plusieurs copies de la petite protéine ubiquitine (Thrower et al., 2000; Weissman, 2001). Toutefois, l'ubiquitination n'est pas suffisante pour que ces protéines soient dégradées. En effet, pour être ciblées pour la dégradation, celles-ci doivent également posséder la deuxième partie du degron, qui est une région non-structurée, située à la fin (Prakash et al., 2004) ou à l'intérieure (Liu et al., 2003; Piwko and Jentsch, 2006; Prakash et al., 2004) d'une chaîne polypeptidique, et bordée par des domaines repliés (Prakash et al., 2004). Alors que la modification ubiquitine sert à cibler le substrat au protéasome, la région non-structurée est le site où la dégradation débute (Prakash et al., 2004). Généralement, les deux parties du degron sont présentes sur la même protéine, mais il arrive qu'elles se situent sur deux chaînes polypeptidiques distinctes, mais liées l'une à l'autre dans un complexe (Prakash et al., 2009).

1.4.3 Fonction transcriptionnelle du protéasome

Le protéasome est principalement connu pour son implication dans la dégradation des protéines (Schrader et al., 2009), mais plusieurs études lui ont également associé un rôle dans le contrôle de la transcription des gènes (Collins and Tansey, 2006). En effet, la transcription génique est un processus complexe exigeant plusieurs joueurs, devant être déposés au bon endroit sur la chromatine en réponse au bon signal, et retirés au bon moment. Le protéasome participe au contrôle de la circulation de ces protéines sur la chromatine, tant par son activité protéolytique que de façon non-protéolytique. En effet, l'activation de la transcription requiert parfois la destruction de protéines ou de complexes inhibiteurs de transcription (Kramer et al., 2003; Metivier et al., 2003; Ostendorff et al., 2002; Perissi et al., 2004), ou un changement dans la nature d'un complexe par la dégradation d'un ou de certains de ses composants. Le protéasome peut aussi contrôler le taux de transcription en dégradant des activateurs de transcription (Fryer et al., 2004; Kim et al., 2003; Muratani et al., 2005; Reid et al., 2003; Salghetti et al., 2000; Tansey, 2001; von der Lehr et al., 2003). Lors de dommages à l'ADN, il peut également dégrader l'ARN polymérase II, pour limiter la transcription d'une séquence d'ADN incorrecte durant sa réparation (Kleiman et al., 2005; Krogan et al., 2004b; Reid and Svejstrup, 2004; Somesh et al., 2005). Les événements suivant l'initiation de la transcription peuvent aussi nécessiter l'intervention du système ubiquitine-protéasome, puisque la dégradation de certains activateurs peut être essentielle au recrutement de facteurs intervenant dans le traitement co-transcriptionnel des ARN (Muratani et al., 2005). En ce qui concerne la terminaison de la transcription, le protéasome a déjà été détecté en 3' de gènes transcriptionnellement actifs, et son inhibition nuit à la terminaison (Gillette et al., 2004).

Certaines protéines du 19S, particulièrement les ATPases de la base, peuvent par ailleurs agir comme un complexe libre, et influencer la transcription par des mécanismes non-protéolytiques. Elles utilisent probablement leur pouvoir de dépliement et de translocation des protéines pour retirer sélectivement un ou certains composants de complexes situés aux promoteurs, régulant ainsi l'activité transcriptionnelle (Braun et al., 1999; Liu et al., 2002;

Perissi et al., 2004). Il a aussi été démontré que des composants du 19S sont nécessaires à l'étape d'élongation de la transcription (Ferdous et al., 2001), ainsi qu'à la méthylation de l'histone H3, marque d'un site actif de transcription (Ezhkova and Tansey, 2004).

1.5 La protéine Hsm3

La protéine Hsm3 a d'abord été identifiée chez des mutants de *Saccharomyces cerevisiae* ayant un taux élevé de mutagenèse spontanée (*high spontaneous mutagenesis*; mutants *hsm*) (Ivanov et al., 1992). Plus précisément, un mutant pour Hsm3 démontre environ dix fois plus de mutations spontanées comparativement à une souche de type sauvage, lorsque soumis à un agent mutagène comme des rayons UV ou du 6-*N*-hydroxylaminopurine (Fedorova et al., 1998). Cette protéine semble impliquée dans la réparation des bases mal appariées dans les cellules à division lente (Fedorova et al., 1998; Fedorova et al., 2004; Fedorova et al., 2000).

Par ailleurs, Hsm3 a également été associé à l'assemblage du protéasome (Funakoshi et al., 2009; Le Tallec et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009). La genèse du protéasome est un processus complexe comprenant plusieurs étapes, incluant la synthèse de toutes ses sous-unités, leur assemblage et leur maturation. Les protéines participant à la formation du 20S ont été bien étudiées (Heinemeyer et al., 2004; Ramos and Dohmen, 2008), et plusieurs sous-unités de la base ou du chapeau nécessaires à l'assemblage du complexe régulateur ont déjà été identifiées (Funakoshi et al., 2004; Isono et al., 2007; Isono et al., 2004; Isono et al., 2005; Santamaria et al., 2003; Takeuchi et al., 1999). Par contre, les facteurs extérieurs au protéasome aidant la formation du 19S ont été peu caractérisés, jusqu'à la découverte récente des chaperonnes Hsm3 (S5b chez l'humain), Nas6 (p28), Nas2 (p27) et Rpn14. Celles-ci participent à l'assemblage de la base du complexe régulateur, et se dissocient du complexe lorsque le 19S est complètement formé (figure 4). Elles stabilisent la base, facilitent son assemblage, et/ou préviennent des associations qui ralentiraient la formation du protéasome. Elles sont fonctionnellement redondantes, particulièrement Hsm3 avec Nas2, et Nas6 avec Rpn14. En effet, la suppression d'un seul de ces facteurs chez la levure n'a pas vraiment

d'effet sur la croissance ou la viabilité des cellules, alors que la suppression d'une de ces paires de gènes (*hsm3-nas2* ou *nas6-rpn14*) entraîne de sévères retards de croissance à une température de 37°C. Le quadruple mutant (*hsm3-nas2-nas6-rpn14*) est, quant à lui, encore plus sensible à cette température que les doubles mutants. De plus, chaque chaperonne lie une sous-unité Rpt différente, et elles aident chacune à une étape d'assemblage particulière (Funakoshi et al., 2009; Le Tallec et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009). Il n'est par contre pas encore établi si la base du 19S se forme complètement avant de se lier au reste du protéasome (Funakoshi et al., 2009; Kaneko et al., 2009; Murata et al., 2009), ou si le 20S ne sert pas plutôt de plateforme sur laquelle les trois sous-complexes précurseurs de la base s'unissent (Park et al., 2009; Roelofs et al., 2009). En ce qui concerne plus particulièrement Hsm3, il s'associe à l'extrémité C-terminale de Rpt1, pour former le sous-complexe précurseur nommé complexe BP1 (*base precursor 1*), composé de Hsm3, Rpt1, Rpt2, Rpt5 et Rpn1 (Funakoshi et al., 2009; Le Tallec et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009). Son homologue humain S5b était d'ailleurs déjà connu pour interagir avec un complexe composé de Rpt1, Rpt2 et Rpn1 (Deveraux et al., 1995; Gorbea et al., 2000). Hsm3/S5b possède des répétitions Arm/HEAT, qui lui permettent de prendre une conformation en hélice α , ce qui favorise les interactions protéines-protéines, probablement sa liaison aux ATPases (Funakoshi et al., 2009; Le Tallec et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009).

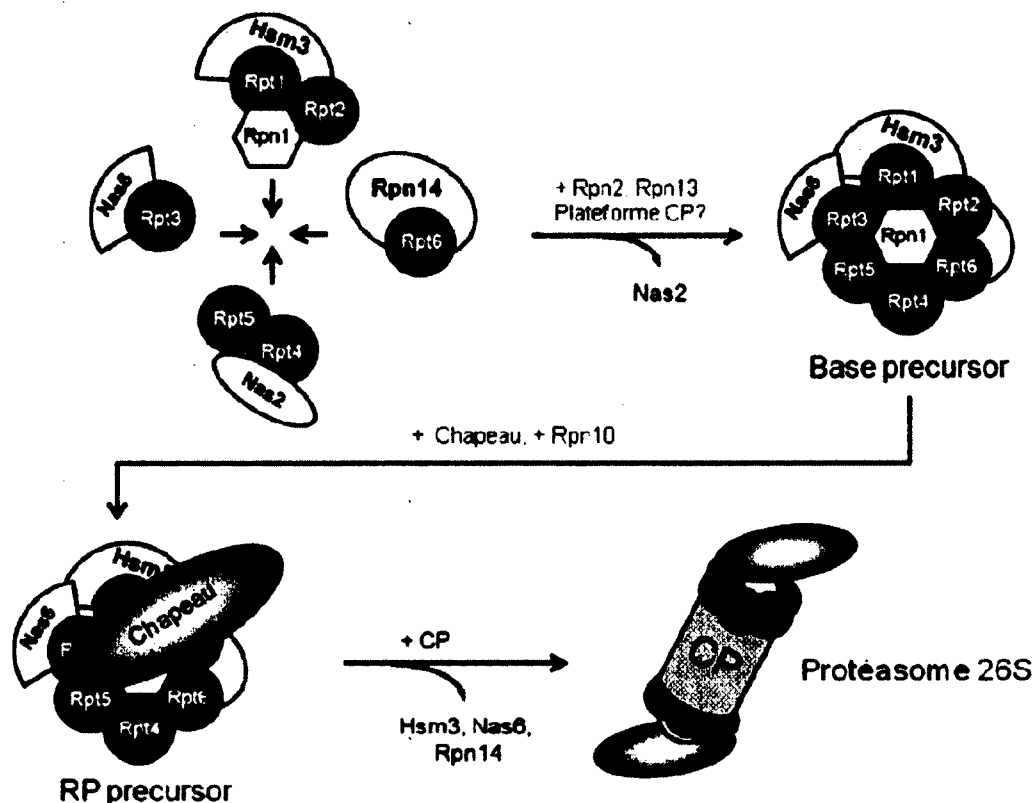


Figure 4. Modèle d'assemblage du complexe régulateur du protéasome, avec les chaperonnes de la base du complexe régulateur (tiré et modifié de Funakoshi et al., 2009). Le point de relâchement de chaque chaperonne est indiqué à l'étape suivant le dernier complexe avec lequel elle a été détectée. RP : complexe régulateur; CP : cœur catalytique.

Dans cette recherche, nous avons tenté de trouver de nouveaux partenaires protéiques du variant d'histone H2A.Z. Comme mentionné précédemment, H2A.Z est un variant de l'histone H2A, essentiel à la survie et à de nombreuses fonctions biologiques chez les eucaryotes. Par contre, il ne possède que 61% d'homologie de séquence avec H2A, ce qui explique une partie de la variabilité entre leurs partenaires et fonctions respectifs (figure 5) (Thatcher and Gorovsky, 1994). Les interactions connues de H2A.Z ont été identifiées alors que celui-ci était en solution, mais peu d'études ont été réalisées jusqu'à maintenant sur les interactions de H2A.Z non-soluble, c'est-à-dire incorporé à la chromatine. Dans le but de mieux comprendre cette histone, la première partie de mon projet de recherche a donc consisté en l'identification

de nouveaux partenaires protéiques de H2A.Z non-soluble chez la levure *S. cerevisiae*. Il était probable que de nouvelles protéines, dont l'interaction avec H2A.Z était jusqu'alors inconnue, soient identifiées de cette façon. C'est en effet ainsi que la protéine Hsm3, une chaperonne du protéasome, a pu être identifiée comme interagissant avec H2A.Z sur la chromatine. L'objectif de la deuxième partie de mon projet a donc été de mieux caractériser cette protéine et ses fonctions.

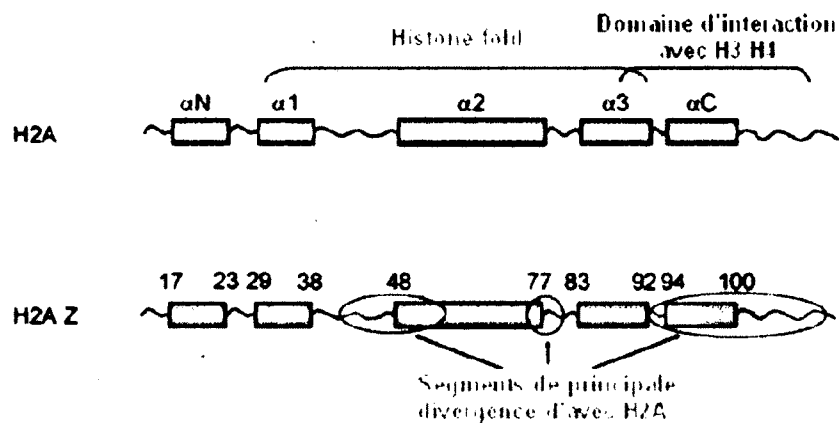


Figure 5. Représentation schématique des structures secondaires de H2A et H2A.Z (tiré et modifié de Zlatanova and Thakar, 2008). Les rectangles représentent les cinq hélices α , et les ovales les principales régions de divergence entre H2A et H2A.Z. Les numéros des acides aminés bordant les différents domaines de H2A.Z sont indiqués.

CHAPITRE 2

Identification de nouveaux partenaires protéiques des histones H2A et H2A.Z associées à la chromatine

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Plasmides et souches de levure

Des souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont été transformées dans le but d'exprimer de façon endogène soit l'histone H2A, soit H2A.Z, fusionnée à une étiquette HBH. Cette étiquette a été insérée aux extrémités 3' des loci *HTA1* ou *HTZ1* dans des levures W303α par une méthode standard de recombinaison homologue d'un produit de PCR (*polymerase chain reaction*, ou réaction en chaîne par polymérase) amplifié à partir du plasmide pFA6a-HBH-kanMX6 (Tagwerker et al., 2006).

Le cadre de lecture des gènes *SAM2*, *HSM3* et *GFD2* a été remplacé par le marqueur de sélection kanMX6 (résistance à la kanamycine et au G418) dans les souches W303α et MAY424 (*htz1Δ*) (Adam et al., 2001), par recombinaison homologue des cassettes *sam2::kanMX6*, *hsm3::kanMX6* et *gfd2::kanMX6*, amplifiées à partir du plasmide pCM367 (Millar et al., 2006; Schneider et al., 1995).

Une sélection de ces transformants a été réalisée sur un milieu contenant du G418. L'intégration et l'expression de l'étiquette HBH ont été vérifiées par immunobuvardage de type Western, en utilisant un anticorps primaire monoclonal dirigé contre l'épitope RGSHHHH (QIAGEN), et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigé contre les IgG de souris (BIO-RAD).

Une étiquette 9Myc-TRP a été insérée à l'extrémité 3' du gène *HSM3* dans les souches VGY001 et VGY002, par recombinaison homologue d'un produit de PCR amplifié à partir du plasmide RY7445. Une sélection de ces transformants a été réalisée sur un milieu sans tryptophane. L'intégration et l'expression de l'étiquette 9Myc-TRP ont été vérifiées par immunobuvardage de type Western, en utilisant l'anticorps primaire 9E10, qui est dirigé contre l'épitope c-Myc, et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigé contre les IgG de souris (BIO-RAD).

Ces souches sont décrites dans le tableau 1.

Tableau 1. Souches de levure

Souche	Génotype
W303α*	<i>MATα, ade2-1, ura3-1, his3-11,15, trp1-1, leu2-3,112, can1-100</i>
MAY424	W303α; <i>htz1Δ::hisG</i>
VGY001	W303α; HTA1-HBH:: <i>kanMX</i>
VGY002	W303α; HTZ1-HBH:: <i>kanMX</i>
VGY022	W303α; <i>sam2Δ::kanMX</i>
VGY023	W303α; <i>hsm3Δ::kanMX</i>
VGY024	W303α; <i>gfd2Δ::kanMX</i>
VGY025	MAY424; <i>sam2Δ::kanMX</i>
VGY026	MAY424; <i>hsm3Δ::kanMX</i>
VGY027	MAY424; <i>gfdΔ::kanMX</i>

*La souche W303α dérive d'une spore germinale d'une souche W303 diploïde offerte par M. A. Osley.

2.1.2 Purification de complexes associés à la chromatine

La purification de nos complexes protéiques a été faite à partir de 2 l de culture cellulaire en ce qui concerne les souches W303α et VGY001, et de 8 l de culture cellulaire de la souche

VGY002. Les cellules ont poussé dans du milieu YPDA (1 % bacto-yeast extract, 2 % bacto-peptone, 2 % glucose, 0,14 g/l adénine) supplémenté de 6 μ M de biotine (pour assurer la biotinylation de l'étiquette HBH) à 30 °C jusqu'à une densité optique à une longueur d'onde de 600 nm (DO_{600}) entre 1,2 et 1,5. Un pontage avec 28 ml de formaldéhyde 37 %, pendant 20 min à 30 °C, puis un blocage avec 50 ml de glycine 2,5 M, pendant 5 min à 30 °C, ont ensuite été réalisés avec chaque litre de culture cellulaire. Les cellules ont été centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min à 4 °C, puis lavées deux fois avec 40 ml de TBS 1X froid et une fois avec 40 ml de tampon de lyse FA froid (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1 % Triton, 0,1 % NaDoc, 0,1 % SDS). À cette étape-ci, elles pouvaient être congelées dans de l'azote liquide puis gardées à -80 °C.

Les échantillons ont par la suite été manipulés sur glace ou dans la chambre à 4 °C. Les culots ont été resuspendus avec 4 ml de tampon de lyse FA, et les cellules ont été lysées avec 3 ml de billes de verre pendant 4 min, 1 min à la fois. Les lysats cellulaires ont été récupérés, combinés deux par deux, puis centrifugés à 16 000 rpm pendant 2 min. Les culots ont été lavés avec 8 ml de tampon MNase (15 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1,4 mM $CaCl_2$, 0,2 mM EGTA, 0,2 mM EDTA), centrifugés de nouveau à 16 000 rpm pendant 2 min, et resuspendus avec 4 ml de tampon MNase. 800 μ l de MNase (nucléase micrococcale) à 5 U/ μ l (1 U/ μ l final) ont été ajoutés, et les échantillons ont été incubés pendant 90 min à 37 °C. La réaction a été arrêtée avec 1 ml de tampon Stop 5X (5 % SDS, 50 mM EDTA). Une centrifugation à 800 x G pendant 5 min a été faite, les surnageants ont été récupérés, puis centrifugés à 8000 x G pendant 5 min. Les surnageants, comportant la chromatine, ont été récupérés, et congelés dans de l'azote liquide puis à -80 °C.

Les lysats ont été dilués avec 40,3 ml de tampon de lyse FA, puis la concentration d'imidazole a été ajustée à 10 mM. 1,6 ml de billes d'agarose Ni-NTA lavées avec du tampon de lyse FA ont été ajoutés à chaque échantillon, et ceux-ci ont été incubés avec une rotation toute la nuit à 4 °C. La résine a ensuite été lavée 4 fois pendant 5 min avec 10 ml de tampon de lyse FA contenant 30 mM d'imidazole. Les complexes ont été élués 2 fois pendant 5 min avec 1 ml de

tampon de lyse FA additionné de 400 mM d'imidazole. Les éluats de toutes les immunoprécipitations faites avec la souche VGY002 ont été combinés, 100 µl de billes de sépharose couplées à la streptavidine et lavées avec du tampon de lyse FA ont été ajoutés à chaque échantillon, et ceux-ci ont été incubés avec une rotation pendant 6 h à 4 °C. Les billes ont été lavées 4 fois pendant 5 min avec 10 ml de tampon de lyse FA contenant 750 mM de NaCl et une concentration croissante de SDS (0,1 %, 0,2 %, et 2 fois à 0,5 %), ont été transférées dans un microtube conique de 1,5 ml, puis ont été chauffées pendant 10 min à 95 °C avec 100 µl de tampon de chargement SDS additionné de 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

Les échantillons ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à gradient (4-15 % d'acrylamide), et ont migrés pendant 45 min à 180 V. Les gels ont été colorés au nitrate d'argent, et chaque colonne a été découpée en 18 bandes d'environ 1 cm par 1 cm chacune. Ces bandes ont été envoyées à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) pour y être analysées par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), et les protéines faisant possiblement partie des complexes immunoprécipités avec H2A ou H2A.Z ont été identifiées.

2.1.3 Essais de croissance avec les souches mutées pour les gènes codant pour les candidats identifiées par spectrométrie de masse

Des cultures cellulaires de notre souche de type sauvage W303α et des mutants MAY424, VGY022, VGY023, VGY024, VGY025, VGY026 et VGY027 ont été faites dans du milieu minimal (0,7 % *yeast nitrogen base without amino acids*, 0,1 % mélange d'acides aminés, 2 % glucose), laissées une nuit à 30°C, lavées deux fois avec de l'eau bidistillée stérile, et diluées à une DO₆₀₀ de 1,0. Trois µl de dilutions en séries de chacune de ces souches ont été déposés sur un milieu YPDA, ainsi que sur des milieux YPDA auquel 75 mM d'hydroxyurée, 6 mM de caféine, ou 2 % de formamide avait été ajouté. Les boîtes de Petri contenant le milieu YPDA et les milieux supplémentés de drogues ont ensuite été incubées à 30 °C deux et trois jours, respectivement.

2.2 Résultats

2.2.1 Construction de souches de levure utilisées pour les immunoprécipitations

Afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques de H2A et de H2A.Z associés à la chromatine, des souches exprimant soit H2A, soit H2A.Z, fusionné à une étiquette HBH, ont été construites. Ces deux souches (VGY001 et VGY002) ont été utilisées dans le but de comparer les interactions spécifiques à chacune de ces histones. L'intégration et l'expression de ces protéines de fusion ont été vérifiées par PCR, puis par immunobuvardage de type Western (figure 6). Une souche de type sauvage (W303 α) nous a servi de témoin négatif. Selon cet immunobuvardage, H2A-HBH et H2A.Z-HBH sont bien exprimés dans les souches VGY001 et VGY001, respectivement. De plus, la protéine H2A-HBH semble être présente en plus grande quantité que H2A.Z-HBH, ce qui concorde avec ce à quoi nous nous attendions, puisque H2A est normalement beaucoup plus exprimé que H2A.Z dans les cellules de levure (Jackson and Gorovsky, 2000).

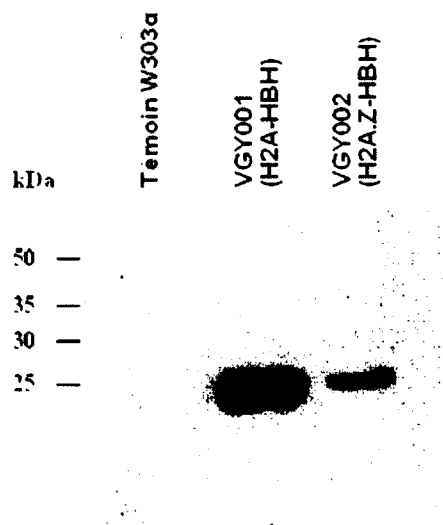


Figure 6. H2A-HBH et H2A.Z-HBH sont exprimés dans les souches VGY001 et VGY002, respectivement. Immunobuvardage de type Western réalisé avec un anticorps primaire dirigé contre l'épitope RGSHHHH. Migration de 20 µg d'extraits protéiques par puit, sur un gel de SDS/PAGE à 15 % d'acrylamide.

2.2.2 Purification et identification de partenaires protéiques de H2A et H2A.Z associés à la chromatine

Pour purifier nos complexes protéiques associés à H2A et H2A.Z sur la chromatine, nous nous sommes basés sur une méthode décrite dans un article de Tardiff *et al.* (2007), dans lequel l'équipe de recherche avait également comme objectif de purifier et de caractériser un complexe de protéines associé à la chromatine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, soit le complexe de l'ARN polymérase II. L'avantage principal de cette méthode est l'utilisation d'une double étiquette, l'étiquette HBH (voir figure 7), qui permet d'effectuer deux étapes de purification, augmentant ainsi l'efficacité de la purification de nos complexes protéiques. L'étiquette HBH comporte un peptide servant de signal de biotinylation, bordé de deux étiquettes hexahistidines. La biotine possédant de l'affinité avec le nickel, et l'histidine avec la streptavidine, nous avons pu utiliser une résine de nickel comme première étape de

purification, puis incuber nos échantillons avec des billes de sépharose couplées à la streptavidine en tant que deuxième étape. Après la purification de nos complexes protéiques, des extraits de protéines pris à différentes étapes de notre protocole ont été comparés par immunobuvardage de type Western, et la différence était bien visible, démontrant ainsi l'efficacité de notre purification (figure 8). Nous avons également testé le temps optimal de digestion de nos extraits cellulaires avec la MNase, pour nous assurer une majorité de mononucléosomes, et ainsi éviter la contamination des nucléosomes ne contenant que des histones H2A par ceux contenant H2A.Z, et vice-versa (figure 9).



Figure 7. Étiquette HBH (tiré de Tagwerker et al., 2006). Cette étiquette est constituée d'un peptide servant de signal de biotinylation, bordé de deux étiquettes hexahistidines, et suivi du terminateur de transcription du gène ADH1 et d'un marqueur de sélection (kanMX6). Elle permet une purification par affinité en tandem des protéines étiquetées, par l'utilisation d'une résine de nickel, suivie d'une incubation avec des billes de sépharose couplées à la streptavidine.

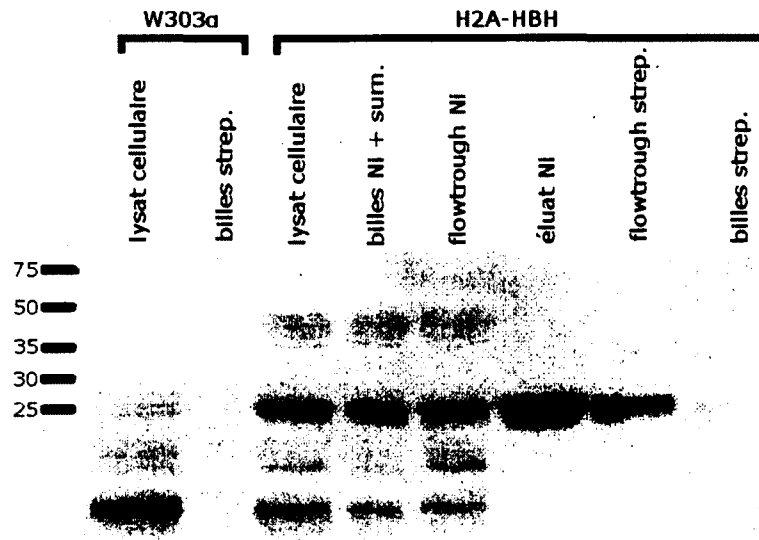


Figure 8. La purification du complexe protéique comportant H2A-HBH est efficace. Immunobuvardage de type Western réalisé avec un anticorps primaire dirigé contre la biotine. Migration de 20 μ l d'extraits protéiques par puit, sur un gel de SDS/PAGE à 15 % d'acrylamide.



Figure 9. Une digestion de 90 minutes avec la MNase est nécessaire pour assurer la présence d'une majorité de mononucléosomes. Migration de 6 μ l d'extraits cellulaires par puit, à différents temps de digestion avec la MNase à 37°C, sur un gel à 1,7 % d'agarose. Coloration au nitrate d'argent.

Nos échantillons purifiés ont ensuite été déposés et ont migré sur un gel de polyacrylamide à gradient (4-15 % d'acrylamide) (figure 10). Une souche de levure de type sauvage (W303 α) nous a servi de témoin négatif, c'est-à-dire qu'elle nous a servi à identifier toutes les protéines se liant de façon non spécifique à notre résine de nickel et à nos billes de sépharose. Le gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent nous permet d'observer une différence entre les protéines associées à H2A-HBH et celles complexées à H2A.Z-HBH. La grosse tache située à une hauteur correspondant à un poids d'environ 10 kDa et présente dans tous les échantillons est également présente lorsque nous faisons migrer des billes de sépharose n'ayant pas été en contact avec aucun extrait cellulaire, ce qui suggère qu'elle représente une contamination provenant directement des billes. Le gel a été découpé en 18 bandes par échantillon, la plus basse étant située à une hauteur correspondant à un poids d'environ 15 kDa. Celles-ci ont été

analysées par spectrométrie de masse, et les partenaires protéiques des deux histones ont ainsi pu être identifiés.

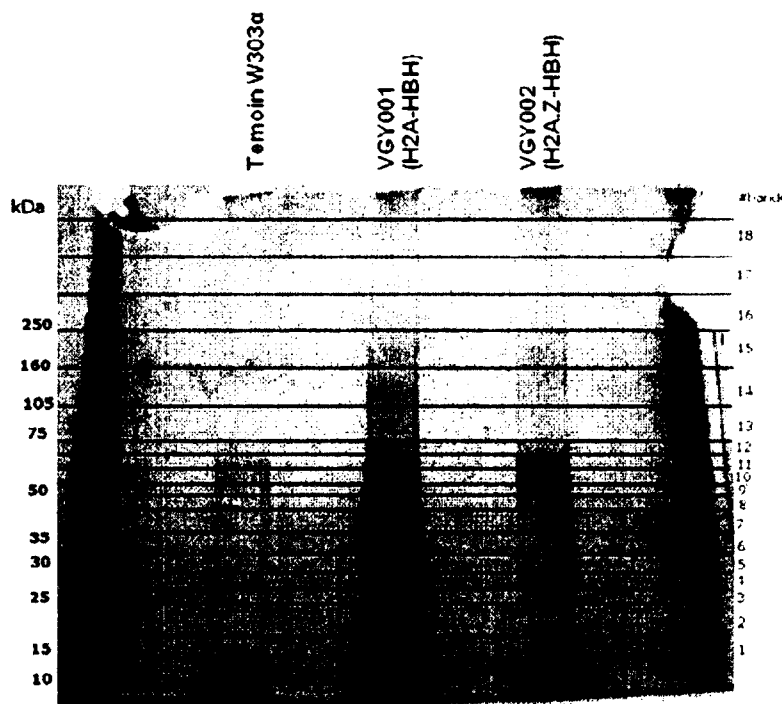


Figure 10. Protéines immunoprécipitées avec H2A-HBH, avec H2A.Z-HBH, ou de façon non spécifique. Migration de 15 µl d'extraits protéiques par puit, sur un gel de SDS/PAGE à gradient (4-15 % d'acrylamide). Coloration au nitrate d'argent. Le découpage des bandes envoyées pour être analysées par spectrométrie de masse est indiqué.

Les candidats qui ne correspondaient pas au poids moléculaire de la bande de gel dans laquelle ils ont été identifiés ont été rejetés, et les autres ont été classés comme étant un partenaire unique à H2A, à H2A.Z, ou partagé entre les deux histones. De cette façon, six partenaires protéiques spécifiques à H2A.Z, et quatre protéines purifiées avec les deux histones ont été détectés (tableau 2).

Tableau 2. Candidats identifiés par spectrométrie de masse et retenus pour analyses subséquentes.

Protéine	Description
Partenaires uniques à H2A.Z	
Tdh3	Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase; impliqué dans la glycolyse et la gluconéogénèse
Sam2	Synthétase S-adenosylméthionine; catalyse le transfert d'un groupement adénosyle sur les méthionines
Hsm3	Impliqué dans la réparation des bases mal appariées; chaperonne de la sous-unité 19S du protéasome
Nmt1	Transférase N-myristoyle; lie un acide myristique aux résidues glycines
Yju3	Hydrolase sérine possédant une similarité de séquence avec la lipase monoglycéride; localisé aux particules de lipide
TyB	Rétrotransposon de levure Ty4 (fragment)
Partenaires partagés entre H2A et H2A.Z	
H2B	Histone du cœur du nucléosome
H2A	Histone du cœur du nucléosome
Smc6	Impliqué dans la maintenance structurelle des chromosomes, la croissance, la réparation de l'ADN, la recombinaison interchromosomale et des chromatides-sœurs
Gfd2	Fonction inconnue; identifié comme un suppresseur de la mutation <i>dbp5</i>

2.2.3 Essais de croissance

Les protéines qui n'étaient pas essentielles à la survie des cellules et qui nous ont semblées avoir le potentiel de détenir un rôle dans la régulation de la transcription ont été sélectionnées, et les gènes codant pour ces protéines ont été interrompus, dans les souches W303a et MAY424 (*htz1Δ*). Des essais de croissance sur différents milieux ont été réalisés avec chacune

de ces souches, pour tenter de détecter des phénotypes reliés à ces mutations. Parmi les drogues testées, l'hydroxyurée est connue pour bloquer la synthèse de l'ADN en inhibant la réductase de ribonucléotide (Eklund et al., 2001). La caféine est un analogue de la purine, et elle entraîne une inhibition de la voie des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases et de la phosphodiesterase de la voie AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Hampsey, 1997). Le formamide, quant à lui, est un solvant ionisant qui déstabilise les liaisons non covalentes, tel les liaisons hydrogène, ce qui affecte la stabilité de l'ADN (Blake and Delcourt, 1996). Bien qu'aucun phénotype particulier n'ait été observé lors de la majorité des essais de croissance, une double mutation *htz1Δsam2Δ* semble restaurer une meilleure croissance sur un milieu contenant de l'hydroxyurée par rapport à la mutation *htz1Δ* seule (figure 11). De plus, un mutant *hsm3Δ* a un phénotype semblable au mutant *htz1Δ* sur un milieu auquel de la caféine a été ajoutée, c'est-à-dire un retard de croissance. Les cellules possédant la double mutation *htz1Δhsm3Δ*, quant à elles, sont encore plus sensibles à la caféine que celles n'ayant que l'une de ces deux interruptions géniques. Ces résultats semblent révéler que la protéine Hsm3 est importante pour la croissance des cellules sur un milieu contenant de la caféine. Finalement, lorsque ces mêmes mutants sont placés sur un milieu possédant du formamide, même si *hsm3Δ* ne démontre pas de phénotype particulier, *htz1Δhsm3Δ* exhibe un retard de croissance plus important que la mutation *htz1Δ* seule.

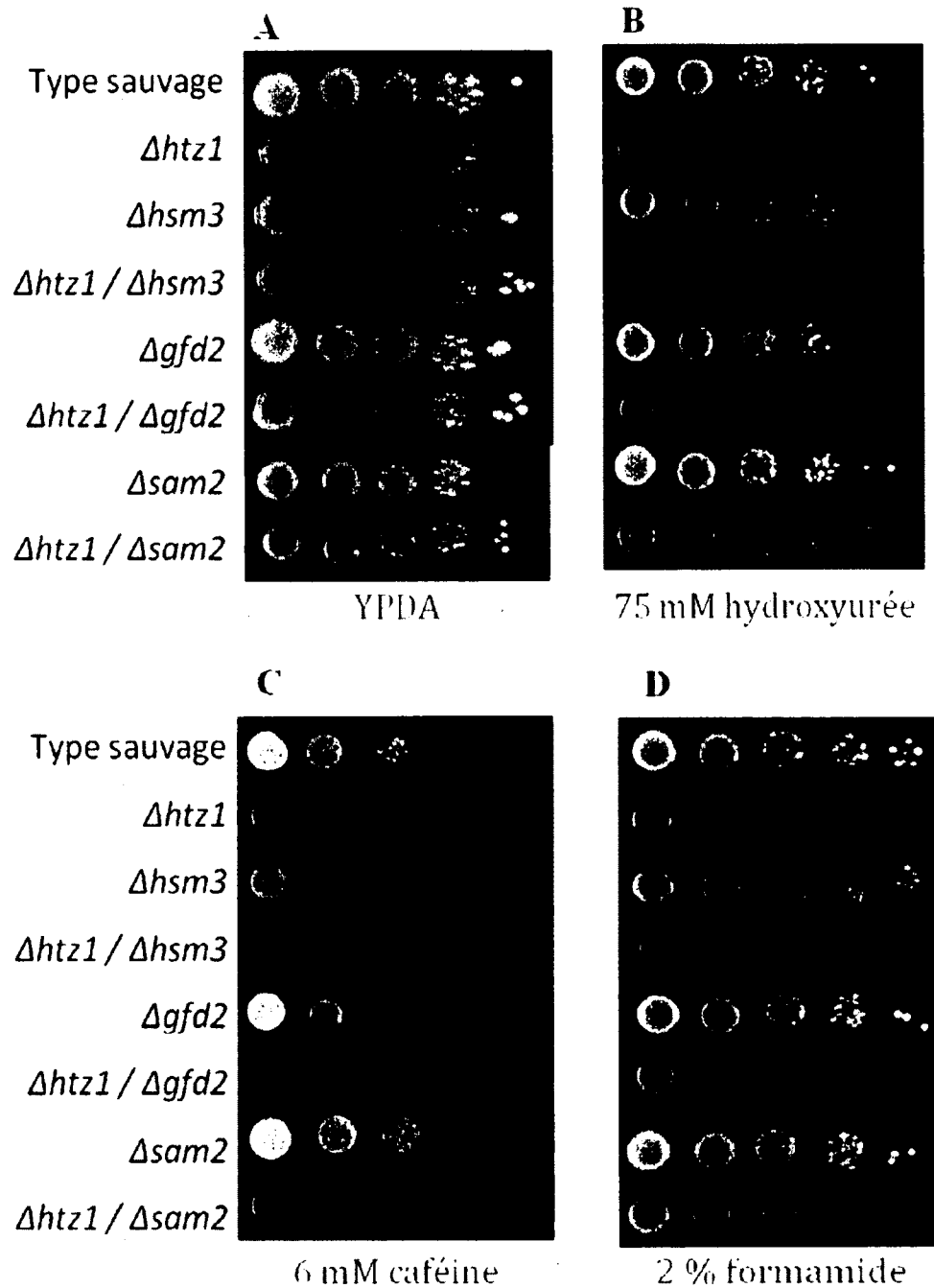


Figure 11. Une mutation pour *hsm3* affecte la croissance des cellules sur un milieu contenant de la caféine. La croissance a été vérifiée sur un milieu YPDA (A), en présence d'hydroxyurée (B), de caféine (C) ou de formamide (D).

2.2.4 Vérification de l'interaction de Hsm3 avec la chromatine

L'interaction potentielle de la protéine Hsm3 avec H2A.Z et la sensibilité du mutant *hsm3Δ* à la caféine nous intrigant, nous avons tenté de confirmer l'interaction entre ces deux protéines. Pour cela, nous avons ajouté, par recombinaison homologue, une étiquette 9Myc-TRP à l'extrémité carboxy-terminale de Hsm3 dans les souches VGY001 et VGY002. Nous avons repêché les complexes protéiques associés à H2A et à H2A.Z sur la chromatine à l'aide de la même méthode que précédemment, et avons vérifié par immunobuvardage de type Western la présence de Hsm3 dans ces complexes. Bien que l'analyse des résultats de spectrométrie de masse nous ait révélé Hsm3 comme partenaire spécifique à l'histone H2A.Z, l'utilisation de cette deuxième méthode nous a permis d'immunoprécipiter Hsm3 tant avec H2A qu'avec H2A.Z (figure 12), nous indiquant que cette interaction n'est finalement pas unique à ce variant d'histone. Ce résultat nous a par ailleurs bien confirmé l'interaction de la protéine Hsm3 avec la chromatine. Une souche de type sauvage (W303α) nous a servi de témoin négatif. Une caractérisation plus approfondie de cette protéine a par la suite été réalisée, et fait l'objet d'un manuscrit en préparation (voir chapitre 2).

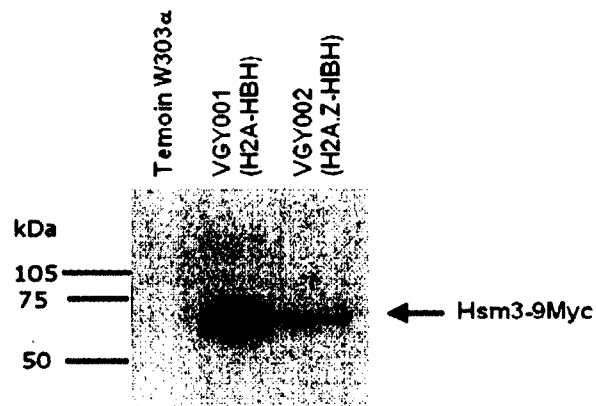


Figure 12. Hsm3 est immunoprécipité avec H2A-HBH et avec H2A.Z-HBH à la chromatine. Immunobuvardage de type Western réalisé avec un anticorps primaire dirigé contre l'épitope c-Myc. Migration de 20 μ l d'extraits protéiques par puit, sur un gel de SDS/PAGE à 12 % d'acrylamide.

CHAPITRE 3

La protéine Hsm3 est nécessaire pour l'induction de l'expression de certains gènes

La protéine Hsm3 était déjà connue dans la littérature comme étant impliquée dans la réparation de l'ADN, ainsi qu'en tant que chaperonne pour l'assemblage de la sous-unité 19S du protéasome. Dans notre laboratoire, nous avons également pu détecter son interaction avec la chromatine, mais son implication en transcription génique n'avait pas encore été étudiée. Les travaux rapportés dans le manuscrit suivant (Guérin, V. et Gaudreau, L. The yeast Hsm3 protein is required for gene expression) ont été réalisés dans le but de caractériser le rôle de Hsm3 en transcription génique. Ce manuscrit sera soumis pour publication à la revue *Yeast*.

À l'aide d'essais de croissance, nous avons démontré la nécessité de Hsm3 pour l'induction de l'expression des gènes *INO1*, *GAL1*, *GAL10* et *SUC2*. Curieusement, cette nécessité dépendait des conditions de culture utilisées. De plus, l'inactivation du protéasome n'a pas entraîné les mêmes effets sur l'induction de l'expression de *INO1* que la suppression de la protéine Hsm3, ce qui ne nous a pas permis de confirmer si le rôle de Hsm3 en transcription est dépendant ou non de sa fonction en tant que chaperonne du protéasome.

Cette étude nous a permis de mieux caractériser une protéine peu connue, Hsm3, en démontrant son importance au niveau du contrôle de la transcription génique. Plus globalement, nous avons ainsi pu accroître nos connaissances en mécanismes de transcription génique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. J'ai réalisé tous les travaux requis pour l'écriture de ce manuscrit. Mon directeur de recherche m'a supervisé pour l'écriture de ce manuscrit.

Guérin, V. et Gaudreau, L. The yeast Hsm3 protein is required for gene expression (manuscrit en préparation).

The yeast Hsm3 protein is required for gene expression

Valérie Guérin and Luc Gaudreau*

Département de biologie
Université de Sherbrooke
Sherbrooke (Québec) J1K 2R1
Canada

***For correspondence:**

E-mail:

Tel.:

Fax:

Key words: *HSM3*, gene expression, proteasome, yeast, transcriptional regulation

Abstract

Hsm3 is a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the DNA mismatch repair system, and which acts as a chaperone in proteasome assembly. In order to further investigate the cellular roles for this protein, a yeast deletion mutant was examined for its ability to induce gene transcription in media containing different drugs or carbon sources. We demonstrate here that a *hsm3Δ* yeast mutant exhibits delayed growth in growth medium supplemented with caffeine, and that Hsm3 has a potential role in transcriptional regulation of some genes in response to extracellular nutrients. Indeed, induction of the *INO1*, *GALI*, *GALI0* and *SUC2* genes depends on Hsm3, even if that necessity appears to vary with the culture medium used. We also wanted to verify if the effect of Hsm3 on gene expression was due to a defect in proteasome assembly but, however, we find that inactivation of the proteasome does not affect *INO1* gene induction to the same extent as Hsm3. These results indicate that Hsm3 may possess an independent function from its proteasome chaperone role. Our findings suggest that Hsm3 is involved in regulation of gene expression and that it may be connected to certain pathways involved in the response to extracellular nutrients.

Introduction

The *HSM3* gene was first identified through isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with high spontaneous mutagenesis (*hsm* mutants) (Ivanov, et al., 1992). The *hsm3* mutation enhances the rates of spontaneous mutation induced by 6-hydroxylaminopurine and UV light (Fedorova, et al., 1998). The Hsm3 protein seems to be implicated in the DNA mismatch repair system in slowly dividing cells (Fedorova, et al., 1998; Fedorova, et al., 2004; Fedorova, et al., 2000).

More recently, Hsm3 was shown to be associated with proteasome assembly (Funakoshi, et al., 2009; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009; Saeki, et al., 2009). The 26S proteasome, the enzyme responsible for degradation of a large fraction of intracellular proteins (Goldberg, 2007; Wolf and Hilt, 2004), is composed of the 20S catalytic core particle (CP), capped by one or two 19S regulatory particle (RP) (Glickman, et al., 1999). The 19S RP contains at least 19 subunits that are distributed between two subcomplexes, the lid and the base (Glickman, et al., 1998). Four proteins - Hsm3, Nas6, Nas2 and Rpn14 - have been identified to participate as chaperone-like cofactors in the assembly of the base of the RP. They stabilize the base, assist its assembly and prevent incorrect subunit associations, but seem to be released from RP complex when the 19S lid binds to the base. They functionally overlap, principally Hsm3 with Nas2, and Nas6 with Rpn14. Indeed, deletion of either factor alone has no obvious effect on growth or viability. However, combining the deletions of each pair (*hsm3-nas2* or *nas6-rpn14*) causes severe growth defects when cells are subjected to higher temperature. The quadruple mutant (*hsm3-nas2-nas6-rpn14*) is even more sensitive than the double mutants. The synthetic growth interactions between deletions of these factors are also paralleled by their effects on proteasome assembly. Each of these chaperones specifically interacts with the C-terminal domain of a different ATPase (Rpt) subunit, and assist a particular assembly step (Funakoshi, et al., 2009; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009; Saeki, et al., 2009). The exact sequence of events during assembly is unclear: the base could be completely formed before its binding to the lid and to the 20S (Funakoshi, et al.,

2009; Kaneko, et al., 2009; Murata, et al., 2009); or the 20S particle could serve as a template on which three base precursor subcomplexes assemble to form the proteasome (Park, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009). Hsm3 interacts with Rpt1, and they form a complex with Rpt2, Rpt5 and Rpn1 termed base precursor 1 (BP1) (Funakoshi, et al., 2009; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009; Saeki, et al., 2009). The S5b protein, a functional homolog of Hsm3 in mammals, was already known to interact with a complex composed of Rpt1, Rpt2 and Rpn1 (Deveraux, et al., 1995; Gorbea, et al., 2000). Hsm3 has a central region composed largely of Arm/HEAT repeats, which form α -helical solenoids and help protein-protein interactions, probably its binding with Rpt1 (Funakoshi, et al., 2009; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009; Saeki, et al., 2009).

Even though an *hsm3Δ* mutant grows like the wild type strain under optimal conditions, we show in this study that it exhibited delayed growth in a medium supplemented with caffeine. This result led us to investigate for a potential novel function for this protein, besides its implication in DNA repair and proteasome assembly. Here we characterize the role of Hsm3 in the transcriptional regulation of many genes that respond to extracellular nutrients (*INO1*, *GAL1*, *GAL10*, *SUC2*). However, the necessity of this protein for induction of gene expression seems to depend highly on culture conditions. Our results suggest that the Hsm3 protein may be connected to some pathways of transcription regulation.

Materials and Methods

Yeast strain and genetic methods

A list of yeast strains is provided in Table 3. Deletion strains used in our study were derived from W303a, and were generated by homologous recombination using the PCR-directed method with the *hsm3::kanMX6*, *opil::kanMX6*, and *ino2::kanMX6* deletion cassettes, in which the *hsm3*, *opil*, and *ino2* open reading frame are replaced by the *kanMX6* (kanamycin and G418 resistance) marker, using the plasmid pCM367 as a template (Millar, et al., 2006;

Schneider, et al., 1995). Each deletion mutant strain was confirmed by PCR. MAY424 (*htz1Δ*) was described previously (Adam, et al., 2001). The Sc658 (*sug1-20*) strain was kindly provided by T. Kodadek (University of Texas).

Table 3. Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
Sc660	W303a; <i>sug1-25</i>	T. Kodadek (University of Texas) (Ferdous, et al., 2001)
VGY023	W303a; <i>hsm3Δ::kanMX</i>	This study
VGY029	W303a; <i>opi1Δ::kanMX</i>	This study
VGY030	W303a; <i>ino2Δ::kanMX</i>	This study
W303a	MATa, <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11, 15</i> <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3, 112</i> <i>can1-100</i>	Adam <i>et al.</i> (2001)

Spotting assays

Wild type and *hsm3Δ* cells were grown at 30 °C in synthetic minimal medium overnight. Cells were then diluted with sterile H₂O at an optical density (OD₆₀₀) of 1.0. Four 10-fold serial dilutions were then made with sterile H₂O, and 3 μl of each dilution was spotted on agar plates containing YPD, or YPD supplemented with 6 mM caffeine. Plates were incubated at 30 °C for 2 days.

Yeast media and gene induction

Gene inductions were performed with 50 ml of yeast grown at 30 °C in YPD (1 % bacto-yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose, 0.14 g/l adenine), synthetic minimal (0.7 % bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.1 % drop-out amino acids mix, 2 % glucose), or homemade nutrient-poor media (prepared according to Difco™ bacto-yeast nitrogen base recipe, with 2 % glucose), at an OD₆₀₀ between 0.6-0.8. *INO1* gene expression was induced by

addition of 8 mM caffeine or 200 ng/ml rapamycin to medium, or by a shift from homemade nutrient-poor to homemade nutrient-poor without inositol medium. For temperature-sensitive *sug1-20* strain, cells were heat shocked first at 37 °C for 15 min and then treated with 8 mM caffeine at 37 °C. To induce expression of the *GAL* genes, 2% galactose was used instead of glucose, and for *SUC2* gene induction, 2 % raffinose and 0.05% glucose were used instead of 2 % glucose. Samples were collected before, and 30 and 60 min after induction. Experiments were performed at least 3 times for each treatment.

mRNA analysis

Ten ml of yeast cells were frozen in liquid nitrogen following collection. Total RNA was isolated with hot acidic phenol (Collart and Oliviero, 2001), treated with DNase I (Applied Biosystem) for 45 min, and 350 ng RNA were used with 0.5 µg of random hexamer to reverse-transcribe complementary DNA. cDNA was then quantified by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). 2 µl (1/25) of the cDNA reaction were mixed with the appropriate oligonucleotides and SYBR Green I (Molecular Probes) in 20 µl final volume, and Q-PCR was performed on an Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, California, United States).

Results

Deletion of the *HSM3* gene selectively affects cell growth

To detect potential novel functions for Hsm3, a deletion mutant was examined for its ability to grow on plates containing different drugs or carbon sources. While the *hsm3Δ* mutant strain grows like the wild type yeast strain on majority of media tested, it appears to have a significant growth defect when grown in the presence of caffeine (Figure 13). Hsm3 protein seems to be important for optimal cell growth in culture medium supplemented with caffeine.



Figure 13. The *hsm3Δ* strain exhibits distinct growth phenotypes. Ten-fold serial dilutions of cells (wild type [WT] and VGY023 [*hsm3Δ*]) were grown overnight in YPD and subsequently spotted on YPD plates, or YPD supplemented with 6 mM caffeine, as indicated. Plates were incubated at 30 °C for 2 days.

Hsm3 is necessary for induction of the *INO1* gene

The association of Hsm3 with chromatin (data not shown), and the phenotype of the deletion mutant suggest that this protein performs additional functions unrelated to its roles in DNA repair and as a chaperone. We thus wanted to investigate on the role of Hsm3 in transcription. We observe that Hsm3 is important for the induction of the inositol 1-phosphate synthase (*INO1*) gene under certain conditions. This gene is known to be fully activated in the absence of inositol and choline (Hirsch and Henry, 1986), but we noticed that it can also be induced in the wild type strain by the addition of caffeine to the culture medium (Figure 14A). Caffeine-mediated *INO1* expression, like its induction resulting from inositol depletion (Bailis, et al., 1987; Donahue and Henry, 1981; Greenberg, et al., 1982a; Greenberg, et al., 1982b; Loewy and Henry, 1984), is controlled by the Ino2 activator, as well as the Opi1 repressor. In the *hsm3Δ* strain, the level of *INO1* mRNA also increased with the addition of caffeine during the time course of the experiment, but to a lower level. This result suggests that Hsm3 affects transcript levels and that it is required for full activation of the *INO1* gene, but surprisingly its necessity seems to depend on the culture medium used. *INO1* induction is repressed in the *hsm3Δ* strain grown in rich medium (YPD) (Figure 14A), but the effect is much less dramatic when yeast cells were grown in synthetic minimal medium (Figure 14B), and the induction is not affected when they were grown in homemade nutrient-poor medium (Figure 14C).

INO1 expression can also be activated by the addition of rapamycin to the culture medium (Figure 14D), or when cells are shifted from complete medium to inositol-depleted medium (Figure 14E). We examined the requirement of Hsm3 in those conditions, and we found that it is necessary to induce *INO1* following the rapamycin stimulation, but not for its induction in response to inositol removal.

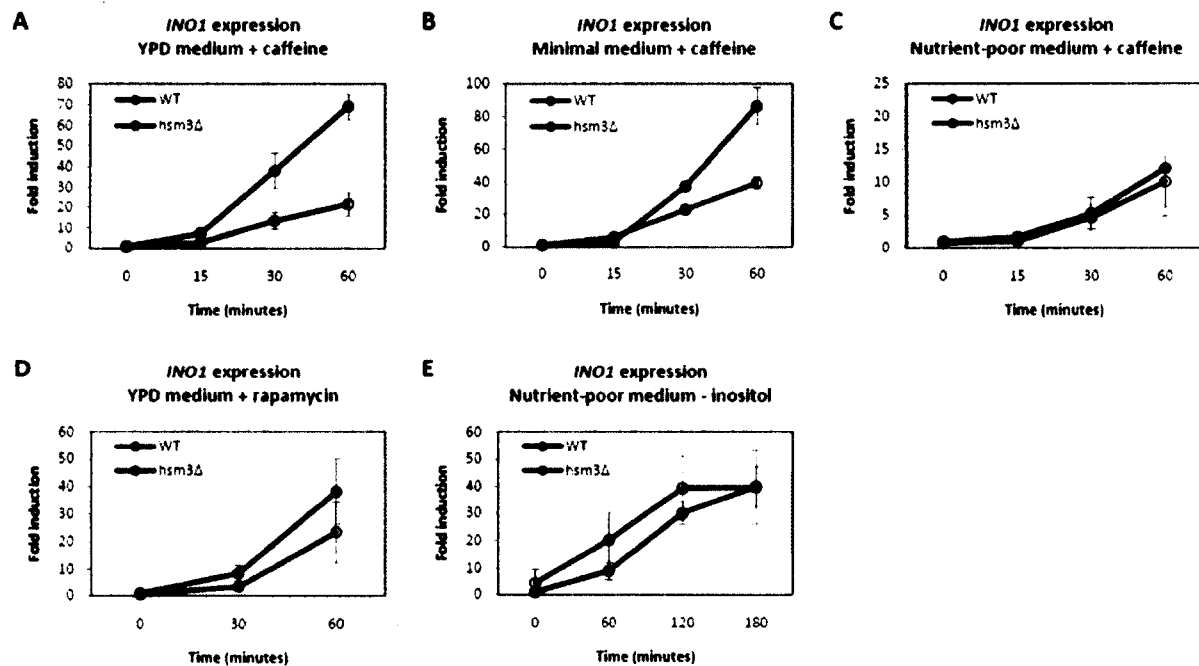


Figure 14. Induction of *INO1* expression depends on Hsm3, but its importance varies with growth conditions. *INO1* expression was measured following induction with 8 mM caffeine in (A) YPD medium, (B) synthetic minimal medium or (C) homemade nutrient-poor medium. Inductions (D) with 200 ng/ml rapamycin in YPD medium, or (E) after a shift from complete medium to inositol-depleted medium, have also been executed. Results were normalized to the *ACT1* expression and are shown as the fold increases to that at time 0. The following strains were used: wild type (WT), VGY023 (*hsm3Δ*), VGY030 (*ino2Δ*), and VGY029 (*opi1Δ*).

Role of Hsm3 in *GAL1*, *GAL10*, and *SUC2* genes expression

Considering that there is a role for Hsm3 in the control of *INO1* gene transcription, we wanted to investigate other genes whose expression could depend on that protein. We show that Hsm3 is also important for the induction of *GAL1* and *GAL10* gene expression, but once again only under certain growth conditions. An increase of *GAL* gene expression is observed after a shift to YP medium containing galactose (De Robichon-Szulmajster, 1958), in the *hsm3Δ* mutant as in the wild type strain, when cells are pregrown in YPD (Figure 15A) or in YP containing glycerol (Figure 15B). However, the *hsm3Δ* mutant exhibits defects in induction of these genes when it was pregrown in YP containing raffinose as the sole carbon source (Figure 15C).

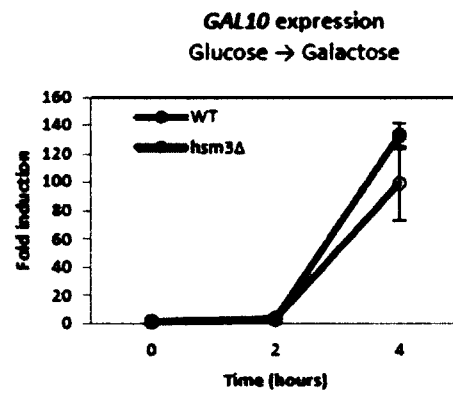
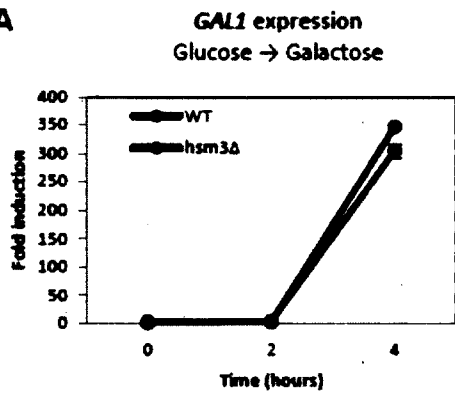
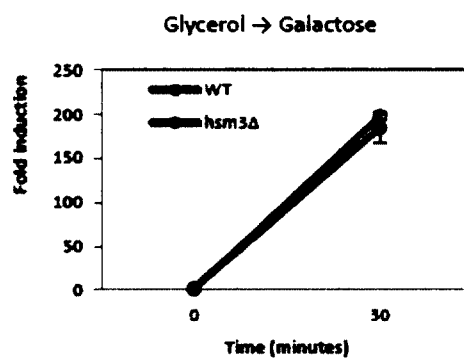
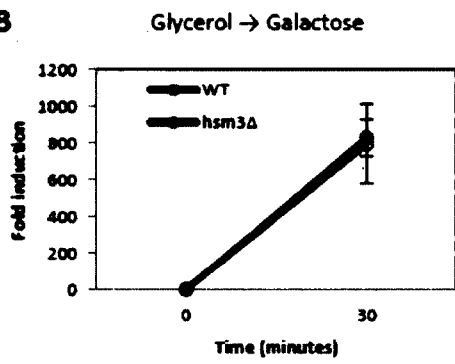
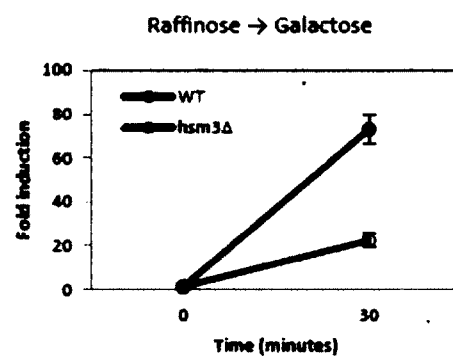
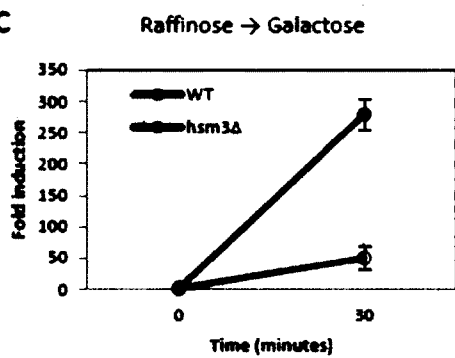
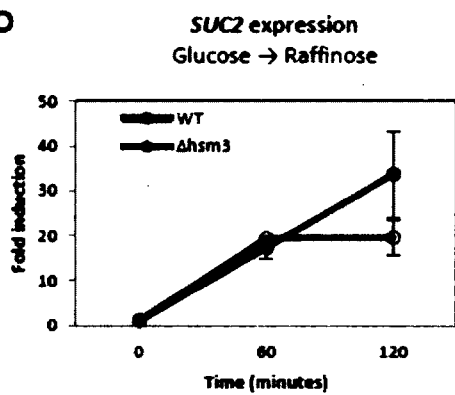
A**B****C****D**

Figure 15. Induction of *GAL1*, *GAL10* and *SUC2* gene expression depends on Hsm3, but its importance varies with growth conditions. *GAL1* and *GAL10* expression was measured following induction with 2 % galactose in wild type (WT) and VGY023 (*hsm3Δ*) cells pregrown in (A) YPD medium, (B) YP containing 3 % glycerol or (C) YP containing 2 % raffinose. (D) *SUC2* expression was measured following a shift from YPD medium to YP containing 2 % raffinose and 0.05 % glucose. Results were normalized to the *ACT1* expression and are shown as the fold increase to that at time 0.

The results obtained at the *GAL* genes appear to be consistent with *HSM3* necessity for *SUC2* induction, an invertase-encoding gene which catalyzes the hydrolysis of both sucrose and raffinose (Gascon, et al., 1968). After a shift from glucose to raffinose (containing low glucose) medium, the *hsm3Δ* mutant strain does not achieve wild type expression levels of *SUC2* (Figure 15D).

Transcription of several other genes (*PDH1*, *PUT1*, *MLS1*, *DAL5*, *FAS1*, *ITR1*, *OLE1*, *INO2*, *INO4*, *OPH1*, *SNA3*, *GAL11*, *GLN1*, *GDH1*, *GAP1*) has also been verified for their Hsm3 dependence, but their induction has led to similar expression levels in the wild type and the *hsm3Δ* mutant strains.

Inactivation of the proteasome does not affect *INO1* gene induction to the same extent as *hsm3Δ*

Taking into consideration that Hsm3 is involved in proteasome assembly (Le Tallec, et al., 2009), and that the proteasome is required for full *INO1* induction (Lipford, et al., 2005), we suspected that the effect of *hsm3Δ* observed on gene expression was due to a defect in proteasome assembly. We employed a yeast strain encoding a *sug1* temperature sensitive allele (*sug1-20* (Ferdous, et al., 2001)) to test if this mutant displays phenotypes similar to the *hsm3Δ* strain. Sug1 is one of six ATPases of the 19S regulatory particle of the proteasome and is involved in its function (Glickman, et al., 1999; Rubin, et al., 1998). As expected, heat

treatment of the Sug1 temperature sensitive strain decreases *INO1* induction in complete medium (Figure 16A). However, contrary to the *hsm3Δ* strain, *INO1* induction is in this case more affected in homemade nutrient-poor medium than in complete medium.

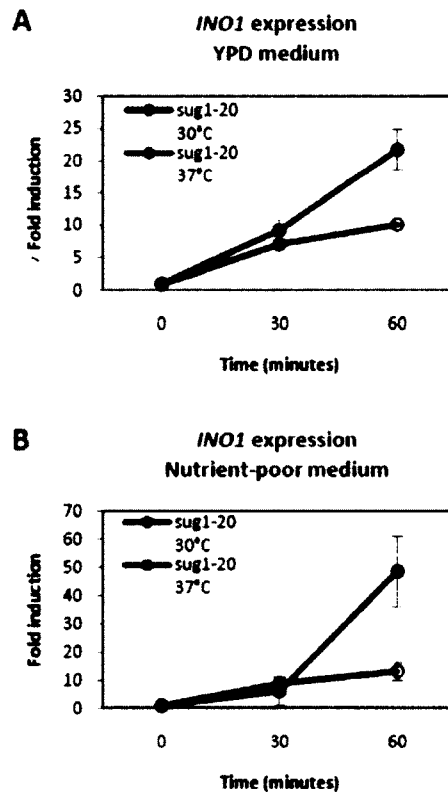


Figure 16. Induction of *INO1* gene expression depends on the proteasome, but its importance varies with growth conditions. *INO1* expression was measured following induction with 8 mM caffeine in *sug1-20* cells pregrown at 30 °C or 37 °C, in (A) YPD medium or (B) homemade nutrient-poor medium. Results were normalized to the *ACT1* expression and are shown as the fold-increase compared to that at time 0.

Discussion

The objectives of this study were to explore new functions for the Hsm3 protein and to characterize them. In this report we have shown that a *S. cerevisiae* strain deleted for the

HSM3 gene has a significant growth defect in culture medium supplemented with caffeine, suggesting that the Hsm3 protein is important for cell growth in the presence of that drug. We have also found that this protein is necessary for induction of *INO1*, *GAL1*, *GAL10* and *SUC2* gene expression, although that necessity seems to depend on growth conditions. We verified the expression of some other genes in *hsm3Δ* strain (*PDH1*, *PUT1*, *MLS1*, *DAL5*, *FAS1*, *ITR1*, *OLE*, *INO2*, *INO4*, *OPI1*, *SNA3*, *GAL11*, *GLN1*, *GDH1*, *GAP1*), but none of them seems to be affected by Hsm3 absence.

Previous reports have shown that Hsm3 is a 19S regulatory particle chaperone (Funakoshi, et al., 2009; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009; Saeki, et al., 2009), and many studies indicate that ubiquitine-proteasome system is involved in transcription control (for a review, see (Collins and Tansey, 2006)). Therefore, it appears likely that the transcriptional defect observed in the *hsm3Δ* strain is similarly due to a defect in proteasome assembly. To verify that hypothesis, we have compared effects of proteasome inactivation or Hsm3 suppression on gene expression. Contrary to what we expected, those two strains (*sug1ts* and *hsm3Δ*) do not show the same effect on gene induction, indicating that Hsm3 may possess an independent function from its proteasome chaperone role. On the other hand, differences observed may result from a higher proteasome requirement in rich medium than in nutrient-poor medium, in which cells have a lower rate of cell division and a less active metabolism. Even if the proteasome was still essential in these conditions, a slight delay in its assembly could not necessarily conduce to a significant transcription reduction. In that case, transcriptional repression observed in the *hsm3Δ* strain could result from a proteasome assembly deficiency. Future experiments should allow us to confirm if Hsm3 role in gene transcription depends or not on proteasome.

It was previously shown that Hsm3 is involved in DNA mismatch repair pathway only in slowly dividing cells (Fedorova, et al., 1998; Fedorova, et al., 2004; Fedorova, et al., 2000) and we have shown above that Hsm3 is essential for expression of some genes induced by different carbon sources, but only in particular media. These results suggest that Hsm3 protein

may be connected to some pathways of response to extracellular nutrients, like the target of rapamycin (TOR) pathway. In response to nitrogen sources or amino acids, TOR pathway regulates both transcription and translation (Lorberg and Hall, 2004; Raught, et al., 2001). Addition of rapamycin to growth media mimics nutrient starvation and inhibits TOR kinases (Cafferkey, et al., 1993; Cardenas and Heitman, 1995; Heitman, et al., 1991; Helliwell, et al., 1994; Kunz, et al., 1993; Zheng, et al., 1995), inducing profound changes in gene transcription (Beck and Hall, 1999; Cardenas, et al., 1999; Hardwick, et al., 1999; Powers and Walter, 1999; Zaragoza, et al., 1998). We have shown that addition of rapamycin does not induce *INO1* gene expression at the same level in the *hsm3Δ* strain than in the wild type strain, indicating a potential implication of the Hsm3 protein in the TOR pathway. However, genes normally induced by TOR pathway inhibition that we have tested (*GDH1*, *GAP1*, *GLN1*) do not seem to be affected by Hsm3 deletion. These results suggest that Hsm3 participates in the downstream response to the TOR inhibition pathway for the activation of a subset of specific genes, like *INO1*.

These results clearly place Hsm3 as a new player in transcription regulation of gene expression in yeast. It would be interesting to check if these new Hsm3 properties can be extrapolated to mammalian proteasome subunit S5b, a functional homolog of the protein Hsm3 (Deveraux, et al., 1995; Le Tallec, et al., 2009; Roelofs, et al., 2009). Further studies on that protein, which is conserved throughout evolution, could provide a better understanding of mechanisms of transcription regulation in response to extracellular nutrients, and of proteasome role in that regulation.

References

- Adam, M., Robert, F., Larochelle, M. and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* **21**, 6270-9.
- Bailis, A. M., Poole, M. A., Carman, G. M. and Henry, S. A. (1987). The membrane-associated enzyme phosphatidylserine synthase is regulated at the level of mRNA abundance. *Mol Cell Biol* **7**, 167-76.
- Beck, T. and Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**, 689-92.
- Cafferkey, R., Young, P. R., McLaughlin, M. M., Bergsma, D. J., Koltin, Y., Sathe, G. M., Faucette, L., Eng, W. K., Johnson, R. K. and Livi, G. P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* **13**, 6012-23.
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J. and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* **13**, 3271-9.
- Cardenas, M. E. and Heitman, J. (1995). FKBPI2-rapamycin target TOR2 is a vacuolar protein with an associated phosphatidylinositol-4 kinase activity. *EMBO J* **14**, 5892-907.
- Collart, M. A. and Oliviero, S. (2001). Preparation of yeast RNA. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 13**, Unit13 12.
- Collins, G. A. and Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* **16**, 197-202.
- De Robichon-Szulmajster, H. (1958). Induction of enzymes of the galactose pathway in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **127**, 28-9.
- Deveraux, Q., Jensen, C. and Rechsteiner, M. (1995). Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem* **270**, 23726-9.
- Donahue, T. F. and Henry, S. A. (1981). myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J Biol Chem* **256**, 7077-85.
- Fedorova, I. V., Gracheva, L. M., Kovaltsova, S. V., Evstuhina, T. A., Alekseev, S. Y. and Korolev, V. G. (1998). The yeast HSM3 gene acts in one of the mismatch repair pathways. *Genetics* **148**, 963-73.
- Fedorova, I. V., Kovaltsova, S. V., Gracheva, L. M., Evstuhina, T. A. and Korolev, V. G. (2004). Requirement of HSM3 gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **554**, 67-75.
- Fedorova, I. V., Kovaltsova, S. V. and Korolev, V. G. (2000). The yeast HSM3 gene is involved in DNA mismatch repair in slowly dividing cells. *Genetics* **154**, 495-6.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. and Johnston, S. A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **7**, 981-91.

- Funakoshi, M., Tomko, R. J., Jr., Kobayashi, H. and Hochstrasser, M. (2009). Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell* **137**, 887-99.
- Gascon, S., Neumann, N. P. and Lampen, J. O. (1968). Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J Biol Chem* **243**, 1573-7.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-23.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* **26**, 21-8.
- Goldberg, A. L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* **35**, 12-7.
- Gorbea, C., Taillandier, D. and Rechsteiner, M. (2000). Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26 S proteasome. S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. *J Biol Chem* **275**, 875-82.
- Greenberg, M. L., Goldwasser, P. and Henry, S. A. (1982a). Characterization of a yeast regulatory mutant constitutive for synthesis of inositol-1-phosphate synthase. *Mol Gen Genet* **186**, 157-63.
- Greenberg, M. L., Reiner, B. and Henry, S. A. (1982b). Regulatory mutations of inositol biosynthesis in yeast: isolation of inositol-excreting mutants. *Genetics* **100**, 19-33.
- Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F. and Schreiber, S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14866-70.
- Heitman, J., Movva, N. R. and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-9.
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R. and Hall, M. N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* **5**, 105-18.
- Hirsch, J. P. and Henry, S. A. (1986). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* inositol-1-phosphate synthase (INO1) gene is regulated by factors that affect phospholipid synthesis. *Mol Cell Biol* **6**, 3320-8.
- Ivanov, E. L., Fedorova, I. V. and Koval'tsova, S. V. (1992). [Isolation and characteristics of new mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased spontaneous mutability]. *Genetika* **28**, 47-55.
- Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K. and Murata, S. (2009). Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* **137**, 914-25.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R. and Hall, M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**, 585-96.

- Le Tallec, B., Barrault, M. B., Guerois, R., Carre, T. and Peyroche, A. (2009). Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome. *Mol Cell* **33**, 389-99.
- Lipford, J. R., Smith, G. T., Chi, Y. and Deshaies, R. J. (2005). A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature* **438**, 113-6.
- Loewy, B. S. and Henry, S. A. (1984). The INO2 and INO4 loci of *Saccharomyces cerevisiae* are pleiotropic regulatory genes. *Mol Cell Biol* **4**, 2479-85.
- Lorberg, A. and Hall, M. N. (2004). TOR: the first 10 years. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 1-18.
- Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. and Grunstein, M. (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* **20**, 711-22.
- Murata, S., Yashiroda, H. and Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 104-15.
- Park, S., Roelofs, J., Kim, W., Robert, J., Schmidt, M., Gygi, S. P. and Finley, D. (2009). Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature* **459**, 866-70.
- Powers, T. and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**, 987-1000.
- Raught, B., Gingras, A. C. and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7037-44.
- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F. E., Huo, Y., Lee, B. H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S. P. and Finley, D. (2009). Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* **459**, 861-5.
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* **17**, 4909-19.
- Saeki, Y., Toh, E. A., Kudo, T., Kawamura, H. and Tanaka, K. (2009). Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* **137**, 900-13.
- Schneider, B. L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q. H. and Futcher, A. B. (1995). Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1265-74.
- Wolf, D. H. and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 19-31.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J. and Schultz, M. C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 4463-70.
- Zheng, X. F., Florentino, D., Chen, J., Crabtree, G. R. and Schreiber, S. L. (1995). TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* **82**, 121-30.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Dans le but de mieux comprendre les fonctions et les mécanismes moléculaires associés au variant d'histone H2A.Z, et par conséquent, le processus de régulation de la transcription, ainsi que les anomalies lui étant reliées, mon projet avait pour objectif d'identifier et de caractériser de nouveaux partenaires protéiques de H2A.Z lorsqu'il est incorporé à la chromatine, en commun ou non avec l'histone canonique H2A, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé et optimisé une méthode de purification et d'identification de complexes associés à la chromatine décrite dans un article de Tardiff *et al.* (2007). Cette méthode a été sélectionnée puisque l'objectif des auteurs était semblable au nôtre, soit la purification d'un complexe protéique associé à la chromatine chez *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, la double étiquette utilisée dans ce protocole, l'étiquette HBH, permet d'exécuter deux étapes de purification plutôt qu'une, nous assurant une meilleure purification de nos complexes. Nous avons ainsi pu identifier de nouveaux partenaires protéiques de H2A.Z, certains en commun avec H2A, d'autres non. Les protéines Tdh3, Sam2, Hsm3, Nmt1, Yju3 et TyB ont été identifiées par cette méthode comme partenaires protéiques uniques à H2A.Z, alors que H2B, H2A, Smc6 et Gfd2 sont celles ayant été repêchées tant avec H2A.Z qu'avec H2A.

Bien que ce protocole convienne bien à nos objectifs et nos conditions expérimentales, son principal aspect négatif a été la trop petite quantité de partenaires protéiques ayant pu être identifiés de cette façon. Plusieurs interactions déjà connues de H2A et H2A.Z, comme les histones H3 et H4, ou des sous-unités du complexe SWR1 en ce qui concerne H2A.Z (Mizuguchi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005), n'ont pas été détectées. Cela pourrait s'expliquer par un manque d'efficacité de l'étape de pontage au formaldéhyde, puisque certaines interactions sur des gènes n'étant pas orientés correctement pour un pontage covalent peuvent ne pas rester

liées au cours de la purification (Hall and Struhl, 2002). Nos étapes de rinçage de billes étant aussi très stringentes, pour assurer une meilleure pureté, elles ont peut-être fait décrocher certaines protéines possédant une plus faible association avec nos complexes. Finalement, si des partenaires protéiques de H2A ou H2A.Z n'étaient présents qu'en faible quantité dans nos échantillons, ou seulement selon certaines conditions de culture cellulaire, il se peut qu'ils n'aient pu être détectés par la spectrométrie de masse.

D'un autre côté, les protocoles sans pontage au formaldéhyde ou sans spectrométrie de masse ne permettent pas non plus d'identifier toutes les interactions protéiques existantes (Tardiff et al., 2007). La méthode que nous avons privilégiée a donc été un bon choix, puisqu'elle permet de purifier des complexes présents de façon *in vivo*, dans la chromatine, et ce, avec une grande pureté. De plus, l'étape de digestion à la MNase permet d'obtenir une majorité de mononucléosomes, empêchant ainsi une contamination croisée, et l'étape de sonication permet de solubiliser tous les complexes protéiques, même s'ils sont très insolubles. Ce protocole n'a par contre pas suffi à détecter toutes les interactions protéiques de nos histones, et il pourrait donc dans le futur être compensé par un autre type de purification ne nécessitant pas l'utilisation du formaldéhyde, comme par exemple une immunoprécipitation modifiée de la chromatine (mCHIP) (Lambert et al., 2009).

Parmi les partenaires protéiques identifiés à l'aide de cette méthode, celle étant essentielle pour la survie des cellules (Nmt1) (Duronio et al., 1989), celle possédant des homologues (Tdh3, avec Tdh1 et Tdh2) (McAlister and Holland, 1985a, b), celles n'ayant que très peu de potentiel d'interaction avec la régulation de la transcription génique (Yju3, TyB), et les histones (H2A et H2B) ont été mises de côté. Les gènes codants pour les protéines restantes ont été interrompus dans une souche de type de sauvage (W303 α) et la souche *htz1 Δ* (MAY424), exception faite du gène *SMC6* dans la souche W303 α , la transformation n'ayant jamais fonctionnée. Nous avons ensuite vérifié les phénotypes découlant d'une suppression de ces protéines (Hsm3, Gfd2 et Sam2) à l'aide d'essais de croissance sur différents milieux. Le phénotype nous ayant semblé le plus intéressant est le retard de croissance du mutant *hsm3 Δ*

sur un milieu contenant de la caféine. En effet, notre objectif premier était de trouver de nouveaux mécanismes moléculaires reliés à H2A.Z, et une liste des gènes dont l'expression est affectée par l'absence de H2A.Z en présence de caféine nous était déjà disponible. De plus, un lien entre les fonctions de Hsm3 et de H2A.Z semblait plausible, puisque Hsm3 (Fedorova et al., 1998; Fedorova et al., 2004; Fedorova et al., 2000), tout comme H2A.Z (Krogan et al., 2004a; Mizuguchi et al., 2004), était déjà connu comme ayant un rôle en réparation de l'ADN. Ces raisons nous ont donc poussés à tenter de mieux caractériser cette protéine.

Ainsi, même si, avec notre première méthode, nous n'avions détecté l'interaction de Hsm3 qu'avec l'histone H2A.Z, nous avons par la suite pu confirmer l'interaction de Hsm3 tant avec H2A que H2A.Z sur la chromatine. Sa liaison avec H2A n'avait probablement pas été révélée au départ à cause de la trop faible quantité de Hsm3 par rapport à l'ensemble des protéines présentes dans notre échantillon. En effet, seulement 2 l de culture cellulaire de notre souche exprimant H2A-HBH ont été suffisants pour obtenir assez de protéines à analyser par spectrométrie de masse, par rapport à 8 l pour notre souche exprimant H2A.Z-HBH. Par ailleurs, ces résultats nous ont suggéré que Hsm3 possède probablement une fonction indépendante de celles qui lui étaient déjà associées en réparation et en tant que chaperonne du protéasome. Nous avons par la suite démontré sa nécessité pour l'induction de l'expression de certains gènes de réponse aux nutriments extracellulaires (*INO1*, *GAL1*, *GAL10*, *SUC2*). Cette nécessité semble par contre varier fortement en fonction des conditions de culture utilisées.

La protéine Hsm3 étant connue comme chaperonne du protéasome (Funakoshi et al., 2009; Le Tallec et al., 2009; Roelofs et al., 2009; Saeki et al., 2009), et le protéasome comme étant impliqué dans le contrôle de la transcription génique (Collins and Tansey, 2006), nous avons soupçonné que les phénotypes observés chez le mutant *hsm3Δ* étaient seulement causés par un défaut dans l'assemblage du protéasome. Nous avons donc comparé les effets de l'inactivation du protéasome à une suppression de notre protéine sur l'expression des gènes. Contrairement à nos attentes, nous avons constaté que ces effets diffèrent, c'est-à-dire que le protéasome est essentiel tant en milieu riche qu'en milieu pauvre, contrairement à Hsm3, qui ne semble

nécessaire qu'en milieu riche. Il semble donc que l'importance de Hsm3 en transcription ne soit pas nécessairement due à un défaut dans l'assemblage du protéasome, mais plutôt à un rôle indépendant du protéasome. D'un autre côté, cette différence pourrait simplement découler de la plus grande demande du protéasome en milieu riche, dans lequel on retrouve beaucoup plus de divisions cellulaires, et de métabolismes plus actifs, que dans un milieu pauvre. Dans ce milieu, l'absence d'une chaperonne entraînerait davantage de conséquences, et les phénotypes observés proviendraient bien d'un simple retard dans la formation du protéasome. Pour vérifier cette dernière théorie, il serait pertinent de construire une souche *hsm3Δsug1Δ*, et d'observer si les effets de ces deux mutations sur l'expression des gènes s'accumulent ou non.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels Hsm3 affecte la transcription génique, nous avons tenté d'immunoprécipiter cette protéine à l'un des gènes dont l'expression est dépendante de Hsm3 (*INO1*, *GAL1*, *GAL10*) ou à un gène codant pour un activateur ou un répresseur de *INO1* (*INO2*, *INO4*, *OP11*), mais sans succès. Nous n'avons donc pas pu confirmer si cette protéine est bien localisée aux gènes qu'elle régule. Nous avons aussi étudié l'expression de gènes dépendants de H2A.Z en présence de caféine (*PDH1*, *PUT1*, *MLS1*, *DAL5*), de gènes activés par Ino2, l'activateur de *INO1* (*FAS1*, *ITR1*, *OLE1*), de gènes codants pour un activateur ou un répresseur de *INO1* (*INO2*, *INO4*, *OP11*), d'un gène situé près de *INO1* sur le chromosome X (*SNA3*), d'un gène codant pour un activateur de *GAL1* et *GAL10* (*GAL11*), ainsi que de gènes qui, comme *INO1*, servent de cible à la voie TOR (*target of rapamycin pathway*) (*GLN1*, *GDH1*, *GAP1*), mais aucun effet particulier n'a pu être observé en absence de Hsm3. Un lien entre notre protéine d'intérêt et la voie TOR, une voie de réponse aux nutriments extracellulaires (Arsham and Neufeld, 2006; Ramanathan and Schreiber, 2007; Rohde et al., 2001), a en effet été considéré, puisqu'il a été démontré par le passé que l'ajout de rapamycine à un milieu de culture inhibe la voie TOR, ce qui entraîne une inhibition de la transcription de *INO1* (Shirra et al., 2005). De plus, la caféine entraîne un effet semblable à celui de la rapamycine, en inhibant la kinase Tor1 de la voie TOR (Kuranda et al., 2006). C'est pourquoi nous avons tenté de vérifier si les effets sur la transcription observés

chez un mutant *hsm3Δ* en présence de caféine pouvaient posséder un lien avec la voie TOR, mais encore une fois, nous n'avons pas pu le démontrer.

Dans un autre ordre d'idée, il a été démontré que certains gènes, dont *INO1* et *GALI*, en colocalisation avec H2A.Z, sont recrutés à la périphérie du noyau lors de l'activation de leur transcription pour assurer une « mémoire transcriptionnelle », c'est-à-dire une réactivation rapide de leur transcription (Brickner et al., 2007; Light et al., 2010). Ce mécanisme étant peu connu, et Hsm3 ayant été repêché avec H2A.Z et possédant un rôle sur le contrôle de l'expression des gènes *INO1* et *GALI*, il pourrait être intéressant de vérifier si Hsm3 interagit avec ce mécanisme de mémoire transcriptionnelle.

Comme future expérience, il serait aussi pertinent de vérifier si ces propriétés nouvellement étudiées de Hsm3 peuvent être transposées à la protéine S5b, l'homologue de Hsm3 dans les cellules de mammifère. Tout comme Hsm3, S5b possède des répétitions Arm/HEAT et est connu comme chaperonne du protéasome (Deveraux et al., 1995; Gorbea et al., 2000; Le Tallec et al., 2009), mais possède peut-être d'autres fonctions inconnues jusqu'à maintenant.

Finalement, bien que le nouveau rôle de Hsm3 en transcription génique nous ait intéressés, nous n'avons pas pu découvrir de nouveaux mécanismes moléculaires associés à H2A.Z, ce qui était notre but premier. Tenter de caractériser davantage les autres protéines identifiées comme partenaires de H2A.Z par la spectrométrie de masse pourrait donc nous apporter de nouvelles connaissances sur les voies par lesquelles cette histone fonctionne. Une analyse des gènes dont l'expression est affectée par la suppression de chacun de ces partenaires protéiques pourrait être faite. Puisque la protéine Nmt1 est essentielle à la survie des cellules, une interruption de gène traditionnelle ne pourrait être effectuée, mais l'utilisation du système *tet-off* pourrait être privilégiée (Gossen and Bujard, 1992). Aucun lien n'a été fait jusqu'à présent entre H2A.Z et ces différents partenaires protéiques, mais en ce concerne la protéine Smc6, puisqu'elle possède un rôle en réparation de l'ADN (Bermudez-Lopez et al., 2010; Onoda et

al., 2004; Zhao and Blobel, 2005), tout comme H2A.Z, il pourrait exister une interaction entre ces protéines dans un des mécanismes moléculaires de réparation de l'ADN.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

En conclusion, mes travaux de maîtrise nous ont permis de mieux caractériser une protéine peu connue, Hsm3, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons pu détecter son interaction avec la chromatine à l'aide d'une technique de purification par affinité en tandem de complexes associés à H2A et H2A.Z. De plus, cette protéine, déjà connue pour son implication dans la réparation de l'ADN et l'assemblage du protéasome, s'est vue attribuer un nouveau rôle en transcription génique, puisque le retrait de Hsm3 des cellules entraîne un retard dans l'induction de l'expression de certains gènes. Il faudrait maintenant tenter de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels elle fonctionne, et identifier les autres joueurs protéiques en faisant partie. En résumé, ce projet nous a permis d'accroître nos connaissances générales en mécanismes de transcription génique chez la levure.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M., and Ausio, J. (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem* 276, 41945-41949.

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol* 21, 6270-6279.

Adkins, N.L., Watts, M., and Georgel, P.T. (2004). To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1677, 12-23.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.

Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F.X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288, 675-679.

Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 9, 923-937.

Altaf, M., Auger, A., Covic, M., and Cote, J. (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochem Cell Biol* 87, 35-50.

Altaf, M., Utley, R.T., Lacoste, N., Tan, S., Briggs, S.D., and Cote, J. (2007). Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin. *Mol Cell* 28, 1002-1014.

Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P., and Tamkun, J.W. (2002). The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J* 21, 5245-5254.

Arsham, A.M., and Neufeld, T.P. (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol* 18, 589-597.

Ausio, J., and Abbott, D.W. (2002). The many tales of a tail: carboxyl-terminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. *Biochemistry* 41, 5945-5949.

Ausio, J., Abbott, D.W., Wang, X., and Moore, S.C. (2001). Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochem Cell Biol* 79, 693-708.

- Badenhorst, P., Voas, M., Rebay, I., and Wu, C. (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev* 16, 3186-3198.
- Baek, H.J., Kang, Y.K., and Roeder, R.G. (2006). Human Mediator enhances basal transcription by facilitating recruitment of transcription factor IIB during preinitiation complex assembly. *J Biol Chem* 281, 15172-15181.
- Baek, H.J., Malik, S., Qin, J., and Roeder, R.G. (2002). Requirement of TRAP/mediator for both activator-independent and activator-dependent transcription in conjunction with TFIID-associated TAF(II)s. *Mol Cell Biol* 22, 2842-2852.
- Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., and Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J* 23, 3314-3324.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3, 781-796.
- Bassing, C.H., Chua, K.F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S.R., Fleming, J.C., Monroe, B.C., Ciccone, D.N., Yan, C., Vlasakova, K., *et al.* (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8173-8178.
- Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C., and Alt, F.W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* 114, 359-370.
- Becker, P.B., and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-273.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.
- Bermudez-Lopez, M., Ceschia, A., de Piccoli, G., Colomina, N., Pasero, P., Aragon, L., and Torres-Rosell, J. (2010). The Smc5/6 complex is required for dissolution of DNA-mediated sister chromatid linkages. *Nucleic Acids Res* 38, 6502-6512.
- Biswas, D., Takahata, S., Xin, H., Dutta-Biswas, R., Yu, Y., Formosa, T., and Stillman, D.J. (2008). A role for Chd1 and Set2 in negatively regulating DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 178, 649-659.

- Black, B.E., and Bassett, E.A. (2008). The histone variant CENP-A and centromere specification. *Curr Opin Cell Biol* 20, 91-100.
- Blake, R.D., and Delcourt, S.G. (1996). Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res* 24, 2095-2103.
- Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 158-163.
- Bradbury, E.M. (2002). Chromatin structure and dynamics: state-of-the-art. *Mol Cell* 10, 13-19.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-226.
- Brehm, A., Tufteland, K.R., Aasland, R., and Becker, P.B. (2004). The many colours of chromodomains. *Bioessays* 26, 133-140.
- Brickner, D.G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P.C., Widom, J., and Brickner, J.H. (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5, e81.
- Buhler, M., Mohn, F., Stalder, L., and Muhlemann, O. (2005). Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol Cell* 18, 307-317.
- Burgio, G., La Rocca, G., Sala, A., Arancio, W., Di Gesu, D., Collesano, M., Sperling, A.S., Armstrong, J.A., van Heeringen, S.J., Logie, C., *et al.* (2008). Genetic identification of a network of factors that functionally interact with the nucleosome remodeling ATPase ISWI. *PLoS Genet* 4, e1000089.
- Camahort, R., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Gerton, J.L. (2007). Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol Cell* 26, 853-865.
- Cantin, G.T., Stevens, J.L., and Berk, A.J. (2003). Activation domain-mediator interactions promote transcription preinitiation complex assembly on promoter DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12003-12008.
- Carey, M., Li, B., and Workman, J.L. (2006). RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* 24, 481-487.
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M.J., Fernandez-Capetillo, O., Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Eckhaus, M., Ried, T., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003a).

H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* 114, 371-383.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003b). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5, 675-679.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 152, 375-384.

Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R., and Laurent, B.C. (2005). Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 19, 1656-1661.

Chang, S.C., Tucker, T., Thorogood, N.P., and Brown, C.J. (2006). Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci* 11, 852-866.

Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.

Chen, H.T., Bhandoola, A., Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Brown, M.J., Tai, X., Rogakou, E.P., Brotz, T.M., Bonner, W.M., Ried, T., *et al.* (2000). Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* 290, 1962-1965.

Chen, W., Rogatsky, I., and Garabedian, M.J. (2006). MED14 and MED1 differentially regulate target-specific gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 20, 560-572.

Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-271.

Chow, C.M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., Dargelos, E., Canzonetta, C., and Dillon, N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep* 6, 354-360.

Churchill, M.E., and Suzuki, M. (1989). 'SPKK' motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J* 8, 4189-4195.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78, 273-304.

- Collins, G.A., and Tansey, W.P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* 16, 197-202.
- Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Dellaire, G., and Varga-Weisz, P.D. (2002). An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* 32, 627-632.
- Cook, P.J., Ju, B.G., Telese, F., Wang, X., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 458, 591-596.
- Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393, 599-601.
- Costanzi, C., Stein, P., Worrad, D.M., Schultz, R.M., and Pehrson, J.R. (2000). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* 127, 2283-2289.
- de la Serna, I.L., Carlson, K.A., and Imbalzano, A.N. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* 27, 187-190.
- Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berloco, M., *et al.* (2000). The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell* 5, 355-365.
- Deveraux, Q., Jensen, C., and Rechsteiner, M. (1995). Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J Biol Chem* 270, 23726-23729.
- Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S.J., Aparicio, O.M., and Kamakaka, R.T. (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol* 26, 489-501.
- Donner, A.J., Ebmeier, C.C., Taatjes, D.J., and Espinosa, J.M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struct Mol Biol* 17, 194-201.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., and Richmond, T.J. (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 327, 85-96.
- Dou, Y., Mizzen, C.A., Abrams, M., Allis, C.D., and Gorovsky, M.A. (1999). Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal. *Mol Cell* 4, 641-647.
- Downey, M., and Durocher, D. (2006). gammaH2AX as a checkpoint maintenance signal. *Cell Cycle* 5, 1376-1381.

Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001-1004.

Dunican, D.S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D.T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 21, 3253-3257.

Duronio, R.J., Towler, D.A., Heuckeroth, R.O., and Gordon, J.I. (1989). Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality. *Science* 243, 796-800.

Eirin-Lopez, J.M., Ishibashi, T., and Ausio, J. (2008). H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *FASEB J* 22, 316-326.

Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2001). Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* 77, 177-268.

Ezhkova, E., and Tansey, W.P. (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* 13, 435-442.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11, 1183-1187.

Fazio, T.G., Kooperberg, C., Goldmark, J.P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J., and Tsukiyama, T. (2001). Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 21, 6450-6460.

Fedorova, I.V., Gracheva, L.M., Kovaltzova, S.V., Evstuhina, T.A., Alekseev, S.Y., and Korolev, V.G. (1998). The yeast HSM3 gene acts in one of the mismatch repair pathways. *Genetics* 148, 963-973.

Fedorova, I.V., Kovaltzova, S.V., Gracheva, L.M., Evstuhina, T.A., and Korolev, V.G. (2004). Requirement of HSM3 gene for spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 554, 67-75.

Fedorova, I.V., Kovaltzova, S.V., and Korolev, V.G. (2000). The yeast HSM3 gene is involved in DNA mismatch repair in slowly dividing cells. *Genetics* 154, 495-496.

Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., and Johnston, S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 7, 981-991.

Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2, 426-427.

Ferreira, H., Flaus, A., and Owen-Hughes, T. (2007). Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms. *J Mol Biol* 374, 563-579.

Fillingham, J., and Greenblatt, J.F. (2008). A histone code for chromatin assembly. *Cell* 134, 206-208.

Fillingham, J., Keogh, M.C., and Krogan, N.J. (2006). GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol* 84, 568-577.

Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.

Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181-1185.

Flanagan, J.F., and Peterson, C.L. (1999). A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Res* 27, 2022-2028.

Fryer, C.J., White, J.B., and Jones, K.A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 16, 509-520.

Fujita, N., Jaye, D.L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M.R., Boss, J.M., and Wade, P.A. (2004). MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* 119, 75-86.

Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* 117, 6447-6454.

Funakoshi, M., Tomko, R.J., Jr., Kobayashi, H., and Hochstrasser, M. (2009). Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell* 137, 887-899.

Furuyama, S., and Biggins, S. (2007). Centromere identity is specified by a single centromeric nucleosome in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14706-14711.

Furuyama, T., and Henikoff, S. (2009). Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell* 138, 104-113.

Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., Allis, C.D., *et al.* (2007). Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem* 282, 7641-7655.

Geiman, T.M., and Robertson, K.D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J Cell Biochem* 87, 117-125.

Gervais, A.L., and Gaudreau, L. (2009). Discriminating nucleosomes containing histone H2A.Z or H2A based on genetic and epigenetic information. *BMC Mol Biol* 10, 18.

Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.

Gillette, T.G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S.A., and Kodadek, T. (2004). Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5904-5909.

Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Yau, P.M., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 151, 1591-1598.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., and Finley, D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-3162.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., *et al.* (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26, 21-28.

Goldberg, A.L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 35, 12-17.

Goldmark, J.P., Fazzio, T.G., Estep, P.W., Church, G.M., and Tsukiyama, T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* 103, 423-433.

Gonzalez-Romero, R., Mendez, J., Ausio, J., and Eirin-Lopez, J.M. (2008). Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* 413, 1-7.

- Gonzalez, S., Pisano, D.G., and Serrano, M. (2008). Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle* 7, 2601-2608.
- Gorbea, C., Taillandier, D., and Rechsteiner, M. (2000). Mapping subunit contacts in the regulatory complex of the 26 S proteasome. S2 and S5b form a tetramer with ATPase subunits S4 and S7. *J Biol Chem* 275, 875-882.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35-46.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B., and Muller, C.W. (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell* 12, 449-460.
- Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., and Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.
- Hake, S.B., and Allis, C.D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6428-6435.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* 281, 559-568.
- Hall, D.B., and Struhl, K. (2002). The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J Biol Chem* 277, 46043-46050.
- Hampsey, M. (1997). A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1099-1133.
- Han, J., Kim, D., and Morris, K.V. (2007). Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12422-12427.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.

Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V., and Morris, K.V. (2009). Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 37, 2984-2995.

Hazzalin, C.A., and Mahadevan, L.C. (2005). Dynamic acetylation of all lysine 4-methylated histone H3 in the mouse nucleus: analysis at c-fos and c-jun. *PLoS Biol* 3, e393.

Heard, E. (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 15, 482-489.

Heinemeyer, W., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* 61, 1562-1578.

Hemmerich, P., Weidtkamp-Peters, S., Hoischen, C., Schmiedeberg, L., Erliandri, I., and Diekmann, S. (2008). Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol* 180, 1101-1114.

Henikoff, S. (2008). Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet* 9, 15-26.

Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.

Hsu, J.M., Huang, J., Meluh, P.B., and Laurent, B.C. (2003). The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 23, 3202-3215.

Huang, J., and Laurent, B.C. (2004). A Role for the RSC chromatin remodeler in regulating cohesion of sister chromatid arms. *Cell Cycle* 3, 973-975.

Irvine, R.A., Lin, I.G., and Hsieh, C.L. (2002). DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Mol Cell Biol* 22, 6689-6696.

Isono, E., Nishihara, K., Saeki, Y., Yashiroda, H., Kamata, N., Ge, L., Ueda, T., Kikuchi, Y., Tanaka, K., Nakano, A., *et al.* (2007). The assembly pathway of the 19S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell* 18, 569-580.

Isono, E., Saeki, Y., Yokosawa, H., and Toh-e, A. (2004). Rpn7 Is required for the structural integrity of the 26 S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 27168-27176.

- Isono, E., Saito, N., Kamata, N., Saeki, Y., and Toh, E.A. (2005). Functional analysis of Rpn6p, a lid component of the 26 S proteasome, using temperature-sensitive rpn6 mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280, 6537-6547.
- Ivanov, E.L., Fedorova, I.V., and Koval'tsova, S.V. (1992). [Isolation and characteristics of new mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with increased spontaneous mutability]. *Genetika* 28, 47-55.
- Jackson, J.D., and Gorovsky, M.A. (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res* 28, 3811-3816.
- Janowski, B.A., Huffman, K.E., Schwartz, J.C., Ram, R., Nordsell, R., Shames, D.S., Minna, J.D., and Corey, D.R. (2006). Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* 13, 787-792.
- Jansen, L.E., Black, B.E., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol* 176, 795-805.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1519-1529.
- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., and Kusch, T. (2005). In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30, 680-687.
- Johnson, L., Mollah, S., Garcia, B.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Jacobsen, S.E. (2004). Mass spectrometry analysis of *Arabidopsis* histone H3 reveals distinct combinations of post-translational modifications. *Nucleic Acids Res* 32, 6511-6518.
- Johnston, J.A., Johnson, E.S., Waller, P.R., and Varshavsky, A. (1995). Methotrexate inhibits proteolysis of dihydrofolate reductase by the N-end rule pathway. *J Biol Chem* 270, 8172-8178.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., *et al.* (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* 467, 430-435.
- Kajava, A.V. (2002). What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 277, 49791-49798.
- Kaji, K., Caballero, I.M., MacLeod, R., Nichols, J., Wilson, V.A., and Hendrich, B. (2006). The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 8, 285-292.

- Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009). Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* 137, 914-925.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M., and Cairns, B.R. (2004). Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J* 23, 1348-1359.
- Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M., and Muller, J. (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* 282, 1897-1900.
- Keogh, M.C., Kim, J.A., Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., *et al.* (2006). A phosphatase complex that dephosphorylates gammaH2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature* 439, 497-501.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snove, O., Jr., and Rossi, J.J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16230-16235.
- Kim, D.H., Villeneuve, L.M., Morris, K.V., and Rossi, J.J. (2006). Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 793-797.
- Kim, S.Y., Herbst, A., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* 11, 1177-1188.
- Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., *et al.* (2003). The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113, 905-917.
- Kleiman, F.E., Wu-Baer, F., Fonseca, D., Kaneko, S., Baer, R., and Manley, J.L. (2005). BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev* 19, 1227-1237.
- Klose, R.J., and Zhang, Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethyliminination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 307-318.
- Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Donner, A.J., Espinosa, J.M., and Taatjes, D.J. (2009). The human CDK8 subcomplex is a histone kinase that requires Med12 for activity and can function independently of mediator. *Mol Cell Biol* 29, 650-661.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D., and Rine, J. (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* 2, E131.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., *et al.* (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* 22, 3411-3420.

Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., *et al.* (2004a). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13513-13518.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12, 1565-1576.

Krogan, N.J., Lam, M.H., Fillingham, J., Keogh, M.C., Gebbia, M., Li, J., Datta, N., Cagney, G., Buratowski, S., Emili, A., *et al.* (2004b). Proteasome involvement in the repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 16, 1027-1034.

Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* 61, 1147-1166.

Lambert, J.P., Mitchell, L., Rudner, A., Baetz, K., and Figeys, D. (2009). A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Mol Cell Proteomics* 8, 870-882.

Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* 22, 4512-4522.

Le Tallec, B., Barrault, M.B., Guerois, R., Carre, T., and Peyroche, A. (2009). Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome. *Mol Cell* 33, 389-399.

Lee, J.S., Smith, E., and Shilatifard, A. (2010). The language of histone crosstalk. *Cell* 142, 682-685.

Lee, T.I., and Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137.

- Lessard, J., Wu, J.I., Ranish, J.A., Wan, M., Winslow, M.M., Staahl, B.T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I.A., and Crabtree, G.R. (2007). An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55, 201-215.
- Lewis, J.D., Abbott, D.W., and Ausio, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 81, 131-140.
- Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O., and Ausio, J. (2005a). Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* 44, 2529-2535.
- Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J., and Workman, J.L. (2005b). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18385-18390.
- Li, J., Santoro, R., Koberna, K., and Grummt, I. (2005c). The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J* 24, 120-127.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* 3, 817-826.
- Light, W.H., Brickner, D.G., Brand, V.R., and Brickner, J.H. (2010). Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory. *Mol Cell* 40, 112-125.
- Liu, C.W., Corboy, M.J., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 299, 408-411.
- Liu, C.W., Millen, L., Roman, T.B., Xiong, H., Gilbert, H.F., Noiva, R., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2002). Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 277, 26815-26820.
- Liu, X., Li, B., and GorovskyMa (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 16, 4305-4311.
- Lorch, Y., Maier-Davis, B., and Kornberg, R.D. (2006). Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3090-3093.
- Lu, C., Zhu, F., Cho, Y.Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W.Y., Bode, A.M., and Dong, Z. (2006). Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell* 23, 121-132.

- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lyakhovich, A., and Surrallés, J. (2007). New roads to FA/BRCA pathway: H2AX. *Cell Cycle* 6, 1019-1023.
- Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodriguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27, 271-276.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* 10, 882-891.
- Malik, H.S., Vermaak, D., and Henikoff, S. (2002). Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the *Drosophila* centromeric histone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1449-1454.
- Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., Rodriguez de la Concepcion, M.L., Logie, C., Jimeno-Gonzalez, S., Chavez, S., Ammerer, G., and Posas, F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* 28, 326-336.
- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep* 5, 490-496.
- McAlister, L., and Holland, M.J. (1985a). Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* 260, 15019-15027.
- McAlister, L., and Holland, M.J. (1985b). Isolation and characterization of yeast strains carrying mutations in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* 260, 15013-15018.
- McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49, 1115-1156.
- McKittrick, E., Gafken, P.R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1525-1530.
- Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D., and Smith, M.M. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 94, 607-613.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.

- Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R., and Brockdorff, N. (1999). Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J Cell Biol* 147, 1399-1408.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.
- Meyer, K.D., Lin, S.C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. (2010). p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. *Nat Struct Mol Biol* 17, 753-760.
- Millar, C.B., and Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 657-666.
- Mittler, G., Kremmer, E., Timmers, H.T., and Meisterernst, M. (2001). Novel critical role of a human Mediator complex for basal RNA polymerase II transcription. *EMBO Rep* 2, 808-813.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Mizuguchi, G., Xiao, H., Wisniewski, J., Smith, M.M., and Wu, C. (2007). Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell* 129, 1153-1164.
- Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell* 8, 489-498.
- Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457, 413-420.
- Mohrmann, L., and Verrijzer, C.P. (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681, 59-73.
- Morris, K.V., Chan, S.W., Jacobsen, S.E., and Looney, D.J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 305, 1289-1292.
- Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E., and Shen, X. (2004). INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119, 767-775.
- Mousson, F., Ochsenbein, F., and Mann, C. (2007). The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma* 116, 79-93.

- Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B.P., Chen, D.J., Chatterjee, A., and Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 5, 575-590.
- Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 104-115.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K.M., and Tansey, W.P. (2005). The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* 120, 887-899.
- Naar, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* 70, 475-501.
- Nacheva, G.A., Guschin, D.Y., Preobrazhenskaya, O.V., Karpov, V.L., Ebralidse, K.K., and Mirzabekov, A.D. (1989). Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation. *Cell* 58, 27-36.
- Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2005). Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. *Cell Cycle* 4, 760-763.
- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P., and Turner, B.M. (2006). Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16, 125-136.
- Noll, M., and Kornberg, R.D. (1977). Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1. *J Mol Biol* 109, 393-404.
- Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-332.
- Onoda, F., Takeda, M., Seki, M., Maeda, D., Tajima, J., Ui, A., Yagi, H., and Enomoto, T. (2004). SMC6 is required for MMS-induced interchromosomal and sister chromatid recombinations in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3, 429-439.
- Ooi, S.L., and Henikoff, S. (2007). Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol* 19, 257-265.
- Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int J Dev Biol* 53, 231-243.
- Ostendorff, H.P., Peirano, R.I., Peters, M.A., Schluter, A., Bossenz, M., Scheffner, M., and Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* 416, 99-103.

- Park, S., Roelofs, J., Kim, W., Robert, J., Schmidt, M., Gygi, S.P., and Finley, D. (2009). Hexameric assembly of the proteasomal ATPases is templated through their C termini. *Nature* 459, 866-870.
- Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* 279, 24274-24282.
- Patterton, H.G., Landel, C.C., Landsman, D., Peterson, C.L., and Simpson, R.T. (1998). The biochemical and phenotypic characterization of Hho1p, the putative linker histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 7268-7276.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.
- Pearson, C.G., Yeh, E., Gardner, M., Odde, D., Salmon, E.D., and Bloom, K. (2004). Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase. *Curr Biol* 14, 1962-1967.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511-526.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., *et al.* (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12, 1577-1589.
- Peterson, C.L., and Laniel, M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.
- Piwko, W., and Jentsch, S. (2006). Proteasome-mediated protein processing by bidirectional degradation initiated from an internal site. *Nat Struct Mol Biol* 13, 691-697.
- Polo, S.E., and Almouzni, G. (2006). Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16, 104-111.
- Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol* 6, 1236-1244.
- Prakash, S., Inobe, T., Hatch, A.J., and Matouschek, A. (2009). Substrate selection by the proteasome during degradation of protein complexes. *Nat Chem Biol* 5, 29-36.

- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., and Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 830-837.
- Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.
- Ramanathan, A., and Schreiber, S.L. (2007). Multilevel regulation of growth rate in yeast revealed using systems biology. *J Biol* 6, 3.
- Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2008). PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure* 16, 1296-1304.
- Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J* 22, 1599-1607.
- Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 650-655.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11, 695-707.
- Reid, J., and Svejstrup, J.Q. (2004). DNA damage-induced Def1-RNA polymerase II interaction and Def1 requirement for polymerase ubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 279, 29875-29878.
- Ridgway, P., Brown, K.D., Rangasamy, D., Svensson, U., and Tremethick, D.J. (2004). Unique residues on the H2A.Z containing nucleosome surface are important for *Xenopus laevis* development. *J Biol Chem* 279, 43815-43820.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311-1323.
- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., *et al.* (2009). Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* 459, 861-865.
- Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., and Bonner, W.M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275, 9390-9395.

- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rohde, J., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* 276, 9583-9586.
- Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1992). Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci* 17, 93-98.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S., and Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 17, 4909-4919.
- Rusche, L.N., Kirchmaier, A.L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 72, 481-516.
- Saeki, Y., Toh, E.A., Kudo, T., Kawamura, H., and Tanaka, K. (2009). Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell* 137, 900-913.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 437-447.
- Saladin, K.S. (1998). *Anatomy and Physiology: The Unity of Form and Function* (Dubuque, Iowa, The McGraw-Hill).
- Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B., and Tansey, W.P. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3118-3123.
- Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J* 28, 2511-2531.
- Santamaria, P.G., Finley, D., Ballesta, J.P., and Remacha, M. (2003). Rpn6p, a proteasome subunit from *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for the assembly and activity of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278, 6687-6695.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.
- Sanyal, K., Baum, M., and Carbon, J. (2004). Centromeric DNA sequences in the pathogenic yeast *Candida albicans* are all different and unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11374-11379.

Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* 386, 725-737.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887-898.

Schrader, E.K., Harstad, K.G., and Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol* 5, 815-822.

Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 24, 10111-10117.

Schwartz, B.E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* 19, 804-814.

Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C., and Bonner, W.M. (2003). Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* 2, 233-235.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-544.

Shimada, K., Oma, Y., Schleker, T., Kugou, K., Ohta, K., Harata, M., and Gasser, S.M. (2008). Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* 18, 566-575.

Shirra, M.K., Rogers, S.E., Alexander, D.E., and Arndt, K.M. (2005). The Snf1 protein kinase and Sit4 protein phosphatase have opposing functions in regulating TATA-binding protein association with the *Saccharomyces cerevisiae* INO1 promoter. *Genetics* 169, 1957-1972.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844-847.

Simic, R., Lindstrom, D.L., Tran, H.G., Roinick, K.L., Costa, P.J., Johnson, A.D., Hartzog, G.A., and Arndt, K.M. (2003). Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J* 22, 1846-1856.

Simpson, R.T. (1990). Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature* 343, 387-389.

Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem* 280, 41789-41792.

- Smith, D.M., Benaroudj, N., and Goldberg, A. (2006). Proteasomes and their associated ATPases: a destructive combination. *J Struct Biol* 156, 72-83.
- Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A.L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell* 27, 731-744.
- Somesh, B.P., Reid, J., Liu, W.F., Sogaard, T.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2005). Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* 121, 913-923.
- Srinivasan, S., Armstrong, J.A., Deuring, R., Dahlsveen, I.K., McNeill, H., and Tamkun, J.W. (2005). The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development* 132, 1623-1635.
- Stoldt, S., Wenzel, D., Schulze, E., Doenecke, D., and Happel, N. (2007). G1 phase-dependent nucleolar accumulation of human histone H1x. *Biol Cell* 99, 541-552.
- Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E., and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev* 9, 573-586.
- Stoler, S., Rogers, K., Weitze, S., Morey, L., Fitzgerald-Hayes, M., and Baker, R.E. (2007). Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10571-10576.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sutcliffe, E.L., Parish, I.A., He, Y.Q., Juelich, T., Tierney, M.L., Rangasamy, D., Milburn, P.J., Parish, C.R., Tremethick, D.J., and Rao, S. (2009). Dynamic histone variant exchange accompanies gene induction in T cells. *Mol Cell Biol* 29, 1972-1986.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.
- Suzuki, K., Juelich, T., Lim, H., Ishida, T., Watanebe, T., Cooper, D.A., Rao, S., and Kelleher, A.D. (2008). Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region. *J Biol Chem* 283, 23353-23363.
- Swaminathan, J., Baxter, E.M., and Corces, V.G. (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev* 19, 65-76.

Szerlong, H., Hinata, K., Viswanathan, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B.R. (2008). The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat Struct Mol Biol* 15, 469-476.

Taatjes, D.J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 315-322.

Taatjes, D.J., Naar, A.M., Andel, F., 3rd, Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058-1062.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.

Tagwerker, C., Zhang, H., Wang, X., Larsen, L.S., Lathrop, R.H., Hatfield, G.W., Auer, B., Huang, L., and Kaiser, P. (2006). HB tag modules for PCR-based gene tagging and tandem affinity purification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 623-632.

Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K., and Toh-e, A. (1999). Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol* 19, 6575-6584.

Tansey, W.P. (2001). Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev* 15, 1045-1050.

Tardiff, D.F., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M. (2007). Protein characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II after in vivo cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19948-19953.

Thatcher, T.H., and Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22, 174-179.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94-102.

Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A., and Harel-Bellan, A. (2001). Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* 58, 728-736.

Turner, A.M., De La Cruz, J., and Morris, K.V. (2009). Mobilization-competent Lentiviral Vector-mediated Sustained Transcriptional Modulation of HIV-1 Expression. *Mol Ther* 17, 360-368.

Turner, B.M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.

Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.

- Turner, B.M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol* 9, 2-6.
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J.E., and Koshland, D. (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* 16, 991-1002.
- van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S.M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *EMBO J* 26, 4113-4125.
- van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 19, 207-217.
- van Daal, A., White, E.M., Gorovsky, M.A., and Elgin, S.C. (1988). *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic Acids Res* 16, 7487-7497.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Posfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., van der Vlag, J., Peters, A.H., and de Boer, P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* 39, 251-258.
- Venters, B.J., and Pugh, B.F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 44, 117-141.
- Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M., and Touat-Todeschini, L. (2009). Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol* 53, 245-257.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.
- Vincent, J.A., Kwong, T.J., and Tsukiyama, T. (2008). ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat Struct Mol Biol* 15, 477-484.
- Vissers, L.E., van Ravenswaaij, C.M., Admiraal, R., Hurst, J.A., de Vries, B.B., Janssen, I.M., van der Vliet, W.A., Huys, E.H., de Jong, P.J., Hamel, B.C., *et al.* (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 36, 955-957.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-1068.
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K.I., *et al.* (2003). The F-box protein Skp2

participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* 11, 1189-1200.

Wang, G.G., Allis, C.D., and Chi, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling. *Trends Mol Med* 13, 373-380.

Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* 276, 47759-47762.

Weinberg, M.S., Villeneuve, L.M., Ehsani, A., Amarzguioui, M., Aagaard, L., Chen, Z.X., Riggs, A.D., Rossi, J.J., and Morris, K.V. (2006). The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA* 12, 256-262.

Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

Wheeler, R. (2007). Nucleosome (Wikipedia).

Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695, 19-31.

Woodcock, C.L., Safer, J.P., and Stanchfield, J.E. (1976). Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence. *Exp Cell Res* 97, 101-110.

Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J.Q. (2002). A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415, 929-933.

Wu, W.H., Alami, S., Luk, E., Wu, C.H., Sen, S., Mizuguchi, G., Wei, D., and Wu, C. (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1064-1071.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., *et al.* (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86-90.

Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S.H., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., *et al.* (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 457, 57-62.

Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T.L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., and Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10635-10640.

- Yang, F., Vought, B.W., Satterlee, J.S., Walker, A.K., Jim Sun, Z.Y., Watts, J.L., DeBeaumont, R., Saito, R.M., Hyberts, S.G., Yang, S., *et al.* (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* **442**, 700-704.
- Yao, T., and Cohen, R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**, 403-407.
- Yasui, D., Miyano, M., Cai, S., Varga-Weisz, P., and Kohwi-Shigematsu, T. (2002). SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature* **419**, 641-645.
- Yu, E.Y., Steinberg-Neifach, O., Dandjinou, A.T., Kang, F., Morrison, A.J., Shen, X., and Lue, N.F. (2007). Regulation of telomere structure and functions by subunits of the INO80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* **27**, 5639-5649.
- Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C.L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev* **13**, 2369-2374.
- Zemach, A., McDaniel, I.E., Silva, P., and Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* **328**, 916-919.
- Zhang, H., Richardson, D.O., Roberts, D.N., Utley, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cote, J., and Cairns, B.R. (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Mol Cell Biol* **24**, 9424-9436.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**, 219-231.
- Zhao, X., and Blobel, G. (2005). A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4777-4782.
- Zhou, J., Chau, C.M., Deng, Z., Shiekhatar, R., Spindler, M.P., Schepers, A., and Lieberman, P.M. (2005). Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J* **24**, 1406-1417.
- Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A., and Muylldermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* **395**, 402-405.
- Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* **16**, 166-179.